

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 31 274 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 31 274.8
㉒ Anmeldetag: 22. 7. 97
㉔ Offenlegungstag: 28. 1. 99

㉕ Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/63
C 12 N 15/70
C 12 N 15/74
C 12 N 15/81
C 12 N 1/00
C 12 N 1/21
C 12 N 1/19
C 12 P 17/18
C 07 D 495/04

DE 197 31 274 A 1

㉑ Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

㉒ Erfinder:
Schröder, Hartwig, Dr., 69226 Nußloch, DE; Hauer,
Bernhard, Dr., 67136 Fußgönheim, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ㉓ Verfahren zur Herstellung von Biotin
- ㉔ Die Erfindung betrifft ein Genkonstrukt enthaltend ein Biotingen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3, Organismen, die dieses Genkonstrukt enthalten, die Verwendung dieser Sequenzen oder des Genkonstrukts zur Herstellung von Biotin, sowie ein Verfahren zur Herstellung von Biotin.

DE 197 31 274 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Genkonstrukt enthaltend ein Biotingen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3. Organismen, die dieses Genkonstrukt enthalten, die Verwendung dieser Sequenzen oder des Genkonstrukts zur Herstellung von Biotin, sowie ein Verfahren zur Herstellung von Biotin.

Als Coenzym spielt Biotin (Vitamin H) eine essentielle Rolle bei enzymkatalysierten Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen. Biotin ist damit ein essentieller Faktor in lebenden Zellen. Biotin muß von fast allen Tieren und einigen Mikroorganismen von außen aufgenommen werden, da sie Biotin nicht selber synthetisieren können. Es ist damit für diese Organismen ein essentielles Vitamin. Bakterien, Hefen und Pflanzen hingegen können Biotin aus Vorstufen selbst synthetisieren (Brown et al. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9, 1991 : 295-326, DeMoll, E., *Escherichia coli and Salmonella*, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996 : 704-708, ISBN 1-55581-084-5).

Die Biotinsynthese wurde in bakteriellen Organismen speziell im gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* und im grampositiven Bakterium *Bacillus sphacricus* untersucht (Brown et al. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9, 1991 : 295-326). Als erstes bisher bekanntes Intermediat in *E. coli* wird Pimelyl-CoA (PmCoA) angesehen, das aus der Fettsäuresynthese stammt (DeMoll, E., *Escherichia coli and Salmonella*, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996 : 704-708, ISBN 1-55581-084-5 1996). Der Syntheseweg dieser Biotin-Vorstufe in *E. coli* ist bisher weitgehend unbekannt (Ifuku 1993, Lemoine 1996). Es wurden mit bioC und bioH zwei Gene identifiziert, deren korrespondierende Proteine für die Synthese von Pm-CoA verantwortlich sind. Die enzymatische Funktion der Genprodukte BioH und BioC ist bisher nicht bekannt (Lemoine et al., *Mol. Microbio.* 19, 1996: 645-647, DeMoll, E., *Escherichia coli and Salmonella*, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996 : 704-708, ISBN 1-55581-084-5). Pm-CoA wird in vier weiteren enzymatischen Schritten zum Biotin umgewandelt. Ausgehend vom Pm-CoA findet zuerst die Kondensation mit Alanin zu 7-Keto-8-Amino-Pelargonsäure (KAPA) statt. Das Genprodukt für diese Umsetzung ist BioF (KAPA-Synthetase). KAPA wird mit dem Kosubstrat S-Adenosyl-Methionin durch BioA (DAPA-Aminotransferase) zu 7,8 Diamino-Pelargonsäure transaminiert. Der nächste Schritt führt nach einer ATP-abhängigen Carboxylierungsreaktion zum Dethiobiotin (DTB) und wird durch BioD (Dethiobiotin-Synthase) katalysiert. Im letzten Schritt findet die Umsetzung von DTB zu Biotin statt. Dieser Schritt wird durch BioB (Biotin-Synthetase) katalysiert. Die für die beschriebenen Proteine kodierenden Gene bioF, bioA, bioD, und bioB sind in *E. coli* auf einem bidirektionalen Operon kodiert. Dieses Operon liegt zwischen der λ -attachment-site und dem uvrB Gen Locus bei ca. 17 Minuten auf dem *E. coli* Chromosom (Berlyn et al. 1996 : 1715-1902). Auf diesem Operon sind zusätzlich noch zwei weitere Gene kodiert, von denen das eine, bioC, bereits beschriebene Funktionen in der Synthese von Pm-CoA hat, während einem offenen Leseraster hinter bioA bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte (WO 94/8023, Otsuka et al., *J. Biol. Chem.* 263, 1988 : 19577-85). Hoch konservierte Homologe zu den *E. coli* Proteinen BioF, A, D, B wurden in *B. sphacricus*, *B. subtilis*, *Syneccocystis* sp. (Brown et al. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9, 1991 : 295-326, Bower et al., *J. Bacteriol.* 175, 1996 : 4122-4130, Kaneko et al., *DNA Res.* 3, 3, 1996 : 109-136). Archaeobakterien wie *Methanococcus janaschi*, Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 309, 1, 1994: 29-35) oder in Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Baldet et al., *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie.* 319, 2, 1996 : 99-106)) gefunden.

Die Synthese von Pm-CoA scheint in den beiden bisher untersuchten gram-positiven Mikroorganismen anders zu verlaufen als in *E. coli*. Es konnten keine Homologen von bioH und bioC gefunden werden (Brown et al. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9, 1991: 295-326).

Biotin ist eine optisch aktive Substanz mit drei Chiralitätszentren. Es wird bisher wirtschaftlich nur über eine vielstufige, teure chemische Synthese hergestellt werden.

Alternativ zu dieser chemischen Synthese wurde eine Vielzahl von Versuchen unternommen, ein fermentatives Verfahren zur Herstellung von Biotin mit Mikroorganismen aufzubauen. Durch Klonierung des Biotin-Operons auf multicopy-Plasmide konnte die Biotinsynthese in den mit diesen Genen transformierten Mikroorganismen erhöht werden. Eine weitere Erhöhung der Biotinsynthese wurde durch die Deregulierung der Biotingenexpression über die Selektion von birA-Mutanten erreicht (Pai C. H., *J. Bacteriol.* 112, 1972 : 1280-1287). Die Kombination beider Ansätze, das heißt die Expression der Plasmid-kodierten Biosynthesegene in einem regulationsdefizienten Stamm (EP-B-0 236 429), brachte eine weitere Steigerung der Produktivität. Das Biotin-Operon kann dabei entweder unter Kontrolle seines nativen bidirektionalen Promotors verbleiben (EP-B-0 236 429), oder seine Gene können unter die Kontrolle eines extern regulierbaren Promotors gebracht werden (WO 94/8023).

Durch die bisher verfolgten Ansätze zur fermentativen Herstellung von Biotin in *E. coli* konnte keine wirtschaftlich ausreichende Produktivität erreicht werden. Es zeigte sich, daß die Ausbeute in der fermentativen Herstellung von Biotin durch die unvollständige Umwandlung von DTB zu Biotin durch das BioB-Genprodukt (Biotinsynthase) verursacht wird. Zellen die Mutationen im bioB-Gen tragen, sind nicht in der Lage auf DTB zu wachsen und damit DTB in Biotin umzuwandeln. Der chemische und enzymatische Mechanismus der Umwandlung von DTB zu Biotin ist bisher nur unvollständig verstanden und aufgeklärt.

Durch intensive genetische Untersuchungen konnten bisher keine weiteren an der Reaktion beteiligten Proteine identifiziert werden. Eine Charakterisierung der Umwandlung von DTB zu Biotin wurde bisher ausschließlich in bakteriellen bzw. pflanzlichen Zellextrakten durchgeführt (WO 94/8023, EP-B-0 449 724, Sanyal et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 326, No. 1, 1996 : 48-56 und *Biochemistry* 33, 1994 : 3625-3631, Baldet et al. *Europ. J. Biochem.* 217, 1, 1993 : 479-485, Méjean et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 217, No. 3, 1995 : 1231-1237, Ohshiro et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 9, 1994 : 1738-1741).

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß niedermolekulare Faktoren wie S-Adenosylmethionin, NADPH, Cystein, Thiamin, Fe^{2+} , Asparagin, Serin, Fructose 1-6-bisphosphat die Synthese von Biotin stimulieren (Ohshiro et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 9, 1994: 1738-1741, Birch et al., *J. Biol. Chem.* 270, 32, 1995 : 19158-19165, Ifuk et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 2, 1995: 185-189). Neben diesen niedermolekularen Faktoren wurden weitere Proteine identifiziert, die die Synthese von Biotin aus DTB in Gegenwart von BioB stimulieren. Dabei handelt es sich um Fla-

vodoxin und Flavodoxin-NADPH-Reduktase (Birch et al., J. Biol. Chem. 270, 32, 1995 : 19158-19165, Ifuk et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 2, 1995 : 185-189, Sanyal et al., Arch. Biochem. Biophys. 326, 1, 1996 : 48-56).

Die Biotin- und Liponsäuresynthese weisen eine große Homologie auf. In beiden Synthesewegen wird auf der letzten Synthesestufe zwischen nicht aktivierte C-Atome ein Schwefel bzw. zwei Schwefelatome inseriert. Die Synthese von Liponsäure ist bisher nur unzureichend charakterisiert (DeMoll, E., *Escherichia coli* and *Salmonella*, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996 : 704-708, ISBN 1-55581-084-5). Es wurden bisher nur zwei notwendige Gene in *E. coli* identifiziert: *lipA* und *lipB*.

Beide Gene liegen in einem Operon, mit einem bisher nicht charakterisiertem Open Reading Frame (= ORF) zwischen beiden Genen. Ein weiteres Gen *lplA* ist in der Lage Liponsäure über ein Lipoyl-AMP-Intermediat auf Lysin zu übertragen. Diese Reaktion hat somit Ähnlichkeit mit der Aktivität von *birA*. Zwischen *LipA* und *BioB* konnten durch Sequenzvergleiche homologe Bereiche in der Aminosäuresequenz identifiziert werden. Diese umfassen unter anderem ein Cystein-Cluster. Es konnte gezeigt werden, daß *LipA* für den Einbau von zwei Schwefelatomen in die Liponsäure katalysiert (DeMoll, E., *Escherichia coli* and *Salmonella*, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996 : 704-708, ISBN 1-55581-084-5).

Über die Herkunft des Schwefels im Biotinmolekül existieren widersprüchliche Ergebnisse. Bei Untersuchungen der Biotinsynthese in Gesamtzellextrakten wurde gezeigt, daß in Gegenwart von ^{35}S -markiertem Cystein Radioaktivität in Biotin inkorporiert wurde; weder mit ^{35}S -markiertem Methionin noch mit S-Adenosyl-Methionin konnte ein Schwefel-Einbau ins Biotinmolekül nachgewiesen werden (Ifuku et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 2, 1995 : 184-189, Birch et al., J. Biol. Chem. 270, 32, 1995 : 19158-19165).

Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen mit gereinigtem *BioB*-Protein in Gegenwart von ^{35}S -markiertem Cystein und ohne Zugabe von Zellextrakten, bei denen zwar eine Biotin-Synthese aber kein Einbau von Radioaktivität in das Biotinmolekül beobachtet werden konnte (Sanyal et al., Arch. Biochem. Biophys. 326, 1, 1996 : 48-56, Méjean et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2127, 3, 1995 : 1231-1237). Unter diesen Synthesebedingungen ohne Zellextraktzugabe war die gebildete Biotinmenge niedrig und entsprach maximal ca. 2 Mol Biotin/Mol *BioB* (Sanyal et al., Arch. Biochem. Biophys. 326, 1, 1996 : 48-56) bzw. 0,1 Mol Biotin/Mol *BioB* (Méjean et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2127, 3, 1995 : 1231-1237). Nach diesen Untersuchungen kann ein Einbau von Schwefel in Biotin erfolgen, ohne das Cystein als Schwefeldonor verwendet wird. Diese Biotinbildung ohne externe S-Quelle könnte durch eine Übertragung von Schwefel aus dem in *BioB* nachgewiesenen 2Fe-2S Cluster erklärt werden. Die tatsächliche Schwefelquelle für die Biotinsynthese ist nach wie vor unklar. Damit konnte bisher in vitro keine echte katalytische Aktivität von *BioB* nachgewiesen werden.

Trotz dieser Vielzahl von Ansätzen reicht die Ausbeute an Biotin durch mikrobielle Fermentation bisher für eine industrielle Produktion nicht aus.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein technisches, fermentatives Verfahren zur Herstellung von Biotin zu entwickeln, daß eine möglichst optimale Umwandlung von Dethiobiotin in Biotin aufweist und damit eine verbesserte Biotinsynthese ermöglicht.

Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Biotin, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Biotingen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 sowie seine funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus, der in der Lage ist Biotin zu synthetisieren, exprimiert, diesen züchtet und das synthetisierte Biotin direkt, nach Abtrennung der Biomasse oder nach Reinigung des Biotins verwendet, gelöst.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Biotingene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1 bzw. SEQ ID No. 3 werden in der SwissProt-Datenbank unter den "Accession"-Nummern AE000364 und D90811 geführt. Die Sequenz D90811 wird außerdem von Aiba et al. in DNA Res. 3, 6, 1996 : 363-377 beschrieben. Bei beiden Sequenzen wird in der Datenbank eine Homologie zum NifS-Protein vermerkt.

Weitere Informationen zu diesen Sequenzen sind der Datenbank bzw. der Publikation nicht zu entnehmen.

Durch Expression der Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus läßt sich die Produktivität der Biotinbiosynthese deutlich steigern. Durch die Expression der Gene wird die Synthese von Biotin aus Dethiobiotin um mindestens den Faktor 2 gegenüber der Kontrolle ohne diese Gene, bevorzugt um einen Faktor größer 3, gesteigert. Bevorzugt wird die Sequenz SEQ ID No. 1 verwendet.

Nach Isolierung und Sequenzierung sind die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Biotingene mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 erhältlich, die für die in SEQ ID NO: 2 und SEQ ID No. 4 angegebenen Aminosäuresequenzen oder deren Allelvariationen kodieren. Unter Allelvarianten sind SEQ ID No. 1- oder SEQ ID No. 3-Varianten zu verstehen, die 40 bis 100% Homologie auf Aminosäureebene, bevorzugt 50 bis 100%, ganz besonders bevorzugt 80 bis 100% aufweisen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität aber erhalten bleibt.

Unter Analoge von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 sind beispielsweise ihre bakteriellen, pilzlichen, pflanzlichen oder Hefe-Homologen, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

Derivate sind beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -30 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression erhöht wird. Vorteilhafterweise geschieht dies durch eine veränderte Shine-Dalgarno-Sequenz.

Als prokaryontische Wirtsorganismen des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen prinzipiell alle Biotin synthetisierende

renden gramnegativen oder gram-positiven Bakterien in Frage. Als gramnegative Bakterien seien beispielhaft Enterobacteriaceae wie die Gattungen *Escherichia*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia* oder *Salmonella*, Pseudomonadaceae wie die Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Methanomonas*, *Comamonas*, *Cellulomonas* oder *Acetobacter*, Azotobacteraceae wie die Gattungen *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia* oder *Derrickia*, Neisseriaceae wie die Gattungen *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Kingella*, *Neisseria* oder *Branhamella*, die Rhizobiaceae wie die Gattungen *Rhizobium* oder *Agrobacterium* oder die gram-negativen Gattungen *Zymomonas*, *Chromobacterium* oder *Flavobacterium*, genannt. Als gram-positive Bakterien seien beispielhaft die Endosporen-bildenden gram-positiven aeroben oder anaeroben Bakterien wie die Gattungen *Bacillus*, *Sporolactobacillus* oder *Clostridium*, die coryneformen Bakterien wie die Gattungen *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* oder *Kurtzia*, die Actinomycetales wie die Gattungen *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* oder *Nocardia*, die Lactobacillaceae wie die Gattungen *Lactobacillus* oder *Lactococcus*, die gram-positiven Kokken wie die Gattungen *Micrococcus* oder *Staphylococcus*, genannt.

Bevorzugt werden Bakterien der Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Chromobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* oder *Staphylococcus* im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet. Besonders bevorzugt worden Gattungen und Arten wie *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putabilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Azotobacter vinelandii*, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter paraffinicus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium primorioxidans*, *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium* sp., *Streptomyces lividans*, *Rhizobium leguminosarum* oder *Agrobacterium tumefaciens*. Vorteilhafterweise werden Bakterien verwendet, die schon eine erhöhte natürliche Biotinproduktion besitzen.

Die taxonomische Stellung der aufgeführten Gattungen unterlag in den letzten Jahren einem starken Wandel und befindet sich noch immer im Fluß, da falsche Gattungs- und Artnamen korrigiert werden. Aufgrund dieser in der Vergangenheit häufig erforderlichen taxonomischen Umgruppierungen der genannten Gattungen innerhalb der bakteriellen Systematik sind auch andere als die oben genannten Familien, Gattungen und Arten für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

Als eukaryontische Wirtsorganismen des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen prinzipiell alle Biotin synthetisierenden Organismen in Frage wie Pilze, Hefen, Pflanzen oder pflanzliche Zellen. Als Hefen seien die Gattungen *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Sporobolomyces*, *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces* bevorzugt genannt. Besonders bevorzugt sind die Gattungen und Arten *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Yarrowia lipolytica*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces shibatanus* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

Als Wirtsorganismus können prinzipiell alle Pflanzen verwendet werden, bevorzugt werden Pflanzen, die in der Tierernährung oder in der humanen Ernährung eine Rolle spielen wie Mais, Weizen, Gerste, Roggen, Kartoffeln, Erbsen, Bohnen, Sonnenblumen, Palmen, Hirse, Sesam, Kopra oder Raps. Auch Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Lavandula vera* sind geeignet. Besonders bevorzugt werden pflanzliche Zellkulturen, Protoplasten aus Pflanzen oder Kalus-kulturen.

Vorteilhafterweise werden im erfindungsgemäßen Verfahren Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen oder pflanzliche Zellen verwendet, die in der Lage sind Biotin in das Anzuchtmedium auszuschcheiden und die gegebenenfalls zusätzlich schon eine erhöhte natürliche Biotinsynthese haben. Vorteilhafterweise können diese Organismen noch bezüglich der Regulation ihrer Biotinbiosynthese defekt sein, das heißt es findet keine oder nur eine sehr verringerte Regulation der Synthese statt. Dieser Regulationsdefekt hat zur Folge, daß diese Organismen schon eine wesentlich höhere Biotinproduktivität besitzen. Ein solcher Regulationsdefekt ist beispielsweise von *Escherichia coli* als *bioA*-Defektmutanten bekannt und sollte vorzugsweise in Form eines durch äußere Einflüsse induzierbaren Defektes, beispielsweise temperaturinduzierbar, in den Zellen vorhanden sein. Es können im Prinzip auch Organismen verwendet werden, die keine natürliche Biotinproduktion aufweisen, nachdem sie mit den Biotingenen transformiert wurden.

Um die Biotinproduktivität insgesamt weiter zu steigern sollten die Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhafterweise zusätzlich mindestens ein weiteres Biotingen ausgewählt aus der Gruppe *bioA*, *bioB*, *bioF*, *bioC*, *bioD*, *bioH*, *bioP*, *bioW*, *bioX*, *bioY* oder *bioR* enthalten. Dieses zusätzliche Gen oder diese zusätzlichen Gene können in ein oder mehreren Kopien in der Zelle vorhanden sein. Sie können auf dem gleichen Vektor wie die Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 lokalisiert sein oder auf getrennten Vektoren oder aber chromosomal integriert worden sein. Auch die Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 können ins Genom inseriert werden.

Unter dem erfindungsgemäßen Genkonstrukt sind die Biotingensequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 sowie deren funktionelle Varianten, Analoge oder Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Statt dessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation durch Biotin mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte regulatorische Elemente inseriert werden. Die Biotingene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacI^q*-, T7-, T5-, T3-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, SP6-, λ -PR- oder im λ -P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen

zen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefepromotoren ADC1, Mf α , AC, P-60, CYC1, GAPDH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Im Genkonstrukt können weitere Biotingene ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR in einer oder mehreren Kopien enthalten sein, die einen eigenen Promotor haben können oder aber unter der Regulation des Promotors der Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 liegen können.

Das Genkonstrukt wird zur Expression in den oben genannten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Geeignete Vektoren sind beispielsweise in *E. coli* pL338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPIC236, pMB1.24, pL2000, pUR290, pIN-III¹³-B1, λ gt11 oder pBdCl, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen YEep6, YEep13 oder pEM-BLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die genannten Vektoren stellen eine kleine Auswahl der möglichen Vektoren dar. Weitere Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

Unter Expressionssysteme sind die Kombination aus den oben beispielhaft genannten Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren wie Plasmide, Viren oder Phagen wie das T7 RNA Polymerase/Promoter System oder Vektoren mit regulatorischen Sequenzen für den Phagen λ zu verstehen.

Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme die Kombination aus *Escherichia coli* und seinen Plasmiden und Phagen und den dazugehörigen Promotoren sowie *Bacillus* und seine Plasmide und Promotoren zu verstehen.

Für die vorteilhafte erfindungsgemäße Expression der SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 sind außerdem weitere 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen geeignet.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Biotingene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Biotingenexpression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Biotingenexpression bewirken.

Eine Steigerung der von den Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 abgeleiteten Proteinen und ihrer Enzymaktivität läßt sich zum Beispiel gegenüber den Ausgangsenzymen durch Veränderung der entsprechenden Gensequenzen oder der Sequenzen seiner Homologen durch klassische Mutagenese wie UV-Bestrahlung oder Behandlung mit chemischen Mutagenen und/oder durch gezielte Mutagenese wie site directed mutagenesis, Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) erzielen. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität neben der beschriebenen Genamplifikation durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymsynthese reprimieren und/oder durch Synthese aktiver statt inaktiver Enzyme erreicht werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die Umwandlung von DTB in Biotin und damit die Biotinproduktivität insgesamt über die in die Organismen über Vektoren und/oder chromosomal klonierten Biotingene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 vorteilhaft gesteigert.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 enthaltene Mikroorganismen in einem Medium, das das Wachstum dieser Organismen ermöglicht angezüchtet. Dieses Medium kann ein synthetisches oder ein natürliches Medium sein. Je nach Organismus werden dem Fachmann bekannte Medien verwendet. Für das Wachstum der Mikroorganismen enthalten die verwendeten Medien eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Salze und gegebenenfalls geringe Mengen an Vitamine und Spurenelemente.

Vorteilhafte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Zucker wie Mono-, Di- oder Polysaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Xylose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose, komplexe Zuckerquellen wie Melasse, Zuckerphosphate wie Fructose-1,6-bisphosphat, Zuckeralkohole wie Mannit, Polyole wie Glycerin, Alkohole wie Methanol oder Ethanol, Carbonsäuren wie Citronensäure, Milchsäure oder Essigsäure, Fette wie Sojaöl oder Rapsöl, Aminosäuren wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure oder Aminosäure, die auch gleichzeitig als Stickstoffquelle verwendet werden können.

Vorteilhafte Stickstoffquellen sind organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispiele sind Ammoniumsalze wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Nitrate, Harnstoff, oder komplexe Stickstoffquellen wie Maisquellwasser, Bierhefeautolysat, Sojabohnenmehl, Weizengluten, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Caseinhydrolysat, Hefe oder Kartoffelprotein, die häufig auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen können.

Beispiele für anorganische Salze sind die Salze von Calcium, Magnesium, Natrium, Mangan, Kalium, Zink, Kupfer und Eisen. Als Anion dieser Salze sind besonders das Chlor-, Sulfat- und Phosphat zu nennen. Ein wichtiger Faktor zur Steigerung der Produktivität im erfindungsgemäßen Verfahren ist der Zusatz von Fe^{2+} oder Fe^{3+} -Salzen und/oder Kaliumsalzen zum Produktionsmedium.

Gegebenenfalls werden dem Nährmedium weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, wie beispielsweise Vitamine oder Wachstumsförderer wie Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat oder Pyridoxin, Aminosäuren wie Alanin, Cystein, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Serin, Methionin oder Lysin, Carbonsäuren wie Citronensäure, Ameisensäure, Pinelinsäure oder Milchsäure, oder Substanzen wie Dithiothreitol.

Zur Stabilisierung der Vektoren mit den Biotingenen in den Zellen können gegebenenfalls Antibiotika dem Medium zugesetzt werden.

Das Mischungsverhältnis der genannten Nährstoffe hängt von der Art der Fermentation ab und wird im Einzelfall festgelegt. Die Mediumkomponenten können alle zu Beginn der Fermentation vorgelegt werden, nachdem sie falls erforderlich getrennt sterilisiert oder gemeinsam sterilisiert wurden, oder aber je nach Bedarf während der Fermentation nachgegeben werden.

Die Züchtungsbedingungen werden so festgelegt, daß die Organismen optimal wachsen und daß die bestmöglichen Ausbeuten erreicht werden. Bevorzugte Züchtungstemperaturen liegen bei 15°C bis 40°C. Besonders vorteilhaft sind Temperaturen zwischen 25°C und 37°C. Vorzugsweise wird der pH-Wert in einem Bereich von 3 bis 9 festgehalten. Besonders vorteilhaft sind pH-Werte zwischen 5 und 8. Im allgemeinen ist eine Inkubationsdauer von 8 bis 240 Stunden bevorzugt von 8 bis 120 Stunden ausreichend. Innerhalb dieser Zeit reichert sich die maximale Menge an Biotin im Medium an und/oder ist nach Aufschluß der Zellen verfügbar.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Biotin kann kontinuierlich oder batch-weise durchgeführt werden. Werden aus den mit den Biotingenen transformierten Pflanzenzellen ganze Pflanzen regeneriert, so können diese nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ganz normal angezüchtet und vermehrt werden.

Beispiele

Ausgehend von der Überlegung, daß an der Umsetzung von D'TB zu Biotin außer Bioß und den bekannten weiteren Kofaktoren möglicherweise ein Fe-S-Cluster-regenerierendes Enzym beteiligt sein könnte, wurde der Versuch unternommen ein solches hypotetisches Gen zu identifizieren und zu klonieren.

NifS-Gene sind in der Lage Schwefelatome in einem Fe-S-Cluster von Proteinen, die an der Stickstofffixierung beteiligt sind, zu regenerieren (Zheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993: 2754-2758 und Biochemistry 33, 1994: 4714-4720). Durch Vergleich aller bekannten Proteine der NifS-Klasse in den

Datenbanken Swiss-Prot und PIR mit dem Programmpaket Lasergene (DNA-Star Inc.) unter dem Megalign Modus, konnte ein streng konservierter Bereich dieser Proteine mit der Aminosäuresequenz HK(I,L)xGPxG (x entspricht Aminosäuren mit geringer bzw. nicht erhaltener Konservierung) identifiziert werden. Die Tatsache der vollständigen Konservierung dieser Sequenz deutet auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäuren (= As) in der Funktion dieser Proteine hin.

Diese konservierten Aminosäuren werden im folgenden als Motiv I bezeichnet.

Das derart beschriebene As-Motiv diente als Vergleichsequenz für eine weitere Analyse der Datenbank Swiss-Prot/PIR Release 93 bzw. 94 nach Proteinen bzw. ORF's (= open reading frame) zu suchen, in denen diese NifS-Funktionssequenz vollständig konserviert ist. Als Programm für die Sequenzanalyse wurde das Programm Geneman des Pakets DNA-Star eingesetzt. Die Analyseparameter wurden wie folgt fixiert: Menue "consensus sequence" mit einer 80% Konservierung des Motivs.

Als Ergebnis dieser Recherche wurde gefunden, daß neben bereits als NifS-homologe Proteine identifizierte Proteine weitere Proteine/ bzw. ORF's existieren, die dieses Sequenzmotiv aufweisen. Unter den in der Datenbank enthaltenen weiteren Sequenzen konnte ein offenes Leseraster aus E. coli mit signifikanter Konservierung der Konsensus-Sequenz identifiziert werden, das wie die eigenen Arbeiten zeigten an der Biotinsynthese beteiligt ist. Dieses offene Leseraster mit der Bezeichnung ECU29581_24 (= SEQ ID No. 1 = ORF401) kodiert für ein hypothetisches von dieser Sequenz abgeleitetes Protein von 401 As. Es zeigte sich, daß diese Sequenz im Rahmen der E. coli Genomsequenzierung durch F. Blattner und Mitarbeitern sequenziert worden war (DNA-Research 1996), ohne daß dessen Funktion erkannt worden war. Diese Sequenz (SEQ ID No. 1) wird im Nachfolgenden als BioS1 bezeichnet.

Vergleicht man die Proteinsequenz von BioS1 mit der von NifS aus A. vinelandii (Programm: DNA-Star-"Megalign" im Modus: paarweises Alignment nach Lipman-Pearson, Analyseparameter: k-tuple 2, gap-penalty 4, gap-length-penalty 12) zeigt sich, daß ECU29581_24 auch in anderen Bereichen der Sequenz über einen Sequenzbereich von 218 As eine Homologie von 27,6% zu NifS aus A. vinelandii aufweist. Gegenüber dem als NifS identifiziertem Protein aus Rhodococcus capsulatus beträgt die Homologie 25,3% über einen Bereich von 376 As.

In der Datenbank Swiss-Prot/PIR konnten weitere Sequenzen identifiziert werden, die Homologien zu ECU29581_24 aufweisen (Programm Geneman/ Modus sequence similarity; Einstellungen default). Die höchste gefundene Sequenzähnlichkeit zu ECU29581_24 zeigt ein translaterter ORF (= open reading frame) aus H. influenza (Datenbankbezeichnung HIU00082_62). Zwischen BioS1 und HIU00082_62 wurde eine Sequenzhomologie von 45,5% über die gesamte Länge beider Proteine gefunden. Die Sequenzähnlichkeit bzw. die Homologie beider Proteine ist damit signifikant höher, als zwischen ECU29581_24 (= BioS1) und NifS aus R. capsulatus bzw. A. vinelandii. Es handelt sich damit vermutlich um das H. influenza Homologe zu BioS1.

Von Fleischmann et al. (Science, 269, 1995: 496-512) war neben dem ORF HIU00082_62 ein weiterer ORF (HIU00072_10) in H. influenza aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu NifS gefunden worden.

Aufgrund dieser Beschreibung von Fleischmann et al. wurde gefolgert, daß neben BioS1 auch in E. coli noch ein weiteres NifS-ähnliches Gen existiert. Dieses hypothetische Gen wurde BioS2 genannt.

1. Konstruktion der Vektoren pHs1 und pHs2

Die Plasmide pHs1 und pHs2 bestehen aus verschiedenen sog.-Kassetten, die einen Replikationsursprung, eine Resistenzkassette, einen Promotor, eine Klonierungsstelle, und Terminatoren tragen. Die Plasmide wurden aus unterschiedlichen DNA-Fragmenten zusammengesetzt. Die dafür notwendigen DNA-Fragmente wurden durch PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Plasmiden als Matrizen hergestellt.

a) Herstellung der Kassette mit einem Replikationsursprung

Um den Replikationsursprung aus einem P15A-Replikon-enthaltenden Plasmid als klonierbare Kassette bereitzustellen, wurde durch eine PCR Reaktion mit dem Plasmid pRep4 (Quiagen) mit den Oligonukleotiden P15A.1 (5'-GGCCCCTAGGGGATATATTCGGCTTCCTCGC-3') und P15A.2 (5'-GGCCACTAGTAACAACCTATATCGTATGGGG-3') ein DNA-Fragment von 919 Basen Länge aus dem Plasmid isoliert. Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen AvrII und SpeI in einem geeigneten Puffer geschnitten.

PCR-Bedingungen

Es wurden 2,5 U Taq-Polymerase sowie 15 pMol der Oligonukleotide in 100 µl Ansatzlösung zur Isolierung der Replikationskassette aus dem Plasmid pRep4 verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei 50°C angelagert. Die Elongation erfolgte bei 72°C für 1 min. über 30 Zyklen.

b) Herstellung der Kanamycin-Resistenzkassette

Um eine Kanamycin-Resistenzkassette als klonierbare Kassette bereitzustellen wurde durch eine PCR Reaktion aus einem die Kanamycin-Resistenzkassette enthaltenden Plasmid (pRep4, Quiagen) mit den Oligonukleotiden Kan-R.1 (5'-GGCCGAGCTCTCGAACCCAGAGTCCCGCT-3') und Kan-R.2 (5'-GGCCGACCTCGGAATTCGCCAGCTGGGGCGC-3') ein DNA-Fragment von 952 Basen Länge isoliert. Das Fragment wurde mit AatII und SacI in einem geeigneten Puffer geschnitten.

PCR-Bedingungen

Es wurden 2,5 U Taq-Polymerase sowie 15 pMol der Oligonukleotide in 100 µl Ansatzlösung zur Isolierung der Kanamycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pRep4 verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei 50°C angelagert. Die Elongation erfolgte bei 72°C für 1 min. über 30 Zyklen.

c) Herstellung der Terminationsbereiche

– Um den Terminator T0 aus dem Phagen Lambda als klonierbare Kassette bereitzustellen wurde durch eine PCR Reaktion mit dem Plasmid pDS12-luzi (Schroder II. et al., EMBO Journal. 12, 11, 1993 : 4137-4144) als Matrize mit den Oligonukleotiden T0.1 (5'-GGCCGAGCTCGCTTGGACTCCCTGTGTGATAG-3') und T0.2 (5'-GGCCAC-TAGTGTCTTGGATTCTCACCAATAAAAAACGCC-3') ein DNA-Fragment von 120 Basen Länge isoliert. Das Fragment wurde durch die Enzyme SpeI und SacI in einem geeigneten Puffer geschnitten.

Matrize für T0: pDS12-luzi

Es wurden 2,5 U Taq-Polymerase sowie 15 pMol der Oligonukleotide in 100 µl Ansatzlösung zur Isolierung des Terminationsbereiches aus dem Plasmid pDS12-luzi verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei 50°C angelagert. Die Elongation erfolgte bei 72°C für 0,5 min. über 30 Zyklen. Anschließend wurde ein 120 bp großes Fragment isoliert und aufgereinigt. Dieses wurde mit je 20 U SpeI und SacI verdaut.

– Um den Terminator T1 aus dem rrnB-Operon als klonierbare Kassette bereitzustellen, wurde durch eine PCR Reaktion mit dem Plasmid pDS12-luzi (Schroder et al. siehe oben) als Matrize und mit Hilfe der Oligonukleotide T1.1 (5'-GGCCCCTAGGTCAGGGCGGCGGATTTGTCC-3') und T1.2 (5'-GGCCCTCTAGAGGCATCAAATAA-AACGAAAGGC-3') ein DNA-Fragment von 120 bp Länge isoliert. Das Fragment wurde durch die Enzyme XbaI und AvrII in einem geeigneten Puffer geschnitten.

Matrize für T1: pDS12-luzi

Es wurden 2,5 U Taq-Polymerase sowie 15 pMol der Oligonukleotide in 100 µl Ansatzlösung zur Isolierung des Terminationsbereiches aus dem Plasmid pDS12-luzi verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei 50°C angelagert. Die Elongation erfolgte bei 72°C für 0,5 min. über 30 Zyklen. Anschließend wurde ein 120 bp großes Fragment isoliert und aufgereinigt. Dieses wurde mit je 20 U XbaI und AvrII verdaut.

d) Herstellung der Promotoren für pHS1 und pHS2

Die Oligonukleotide PPHS1.1 (5'-TCGAGATAGCATTTTATCCATAAGATTAGCCGATCCTAAGGTTTACAA-TGTGTAGCGCTC ACAATTATGATAGATTCAATGTGTAGCGGATAACAATTTACACACCGCTAGCGGTAC-3') und PPHS1.2 (5'-CGCTAGCGTGTGTGAATTTGTATCCGCTCACAAATGAATCTATCATAATTTGTAGCGCTCACAAATTTGTAAACCTTAGGATCGGCTAATCTTATGGATAAAAATGCTATC-3') bzw. PPHS2.1 (5'-AATTCCTTCCCTATCAGTGTATAGAGATGAGACTGAGACATC ACCAGGACGCACTGACCG-3') und PPHS2.2 (5'-AATTCGGTCAGTGCCTCCTGGTGATGTCTCAGTATCTCTATCACTGATAGGGATGTCATC TCTATCACTGATAGGGAGG-3') wurden durch chemische Synthese hergestellt. Die Oligonukleotide PPHS1.1 und PPHS1.2 sowie PPHS2.1 und PPHS2.2 wurden jeweils in einer Konzentration von 1 µg/µl vermischt. 5 min bei 95°C inkubiert und dann langsam abgekühlt. Die aneinandergelagerten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 10 ng/µl in der Ligation eingesetzt. Die Oligonukleotide PPHS1.1 und PPHS1.2 bildeten den Promotor für

DE 197 31 274 A 1

das Plasmid pHS1 und die Oligonucleotide PPHS2.1 und PPHS2.2 den für das Plasmid pHS2.

e) Herstellung der Klonierungsstelle

5 Zur Konstruktion der Klonierungsstelle wurden die beiden Oligonukleotide PMCS1.1 (5'-GTACCGGGCCCCCCCC-TCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTTCGAGCC CCGGGGATCCCATGGTA-3') und PMCS1.2 (5'-ACGCGTACCATGGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCCG ACCTCGAGGGGGGGCCCCGTACC-3') synthetisiert. Die beiden Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 1 µg/µl vermischt, 5 min bei 95°C inkubiert und dann langsam abgekühlt. Die aneinandergelagerten Oligonukleotide
10 wurden in einer Konzentration von 10 ng/µl in der Ligation eingesetzt.

f) Klonierungsablauf von pHS1 und pHS2

Ausgehend von pDS12 luci wurde die amp^r-Kassette des Plasmides durch einen SacI/AatII-Verdau herausgeschnitten
15 und durch ein entsprechendes SacI/AatII-Fragment ersetzt, das die Kanamycin-Resistenzkassette enthält. Nach Transformation und Isolierung positiver Klone wurde der erhaltene Vektor SpeI/SacI verdaut und der durch PCR-amplifizierte Terminator T0 als SpeI/SacI-Fragment stromabwärts der Kanamycin-Resistenzkassette eingesetzt. Nach Transformation und Isolierung positiver Klone wurde der erhaltene Vektor mit XbaI/AvrII verdaut und der durch PCR-amplifizierte Terminator T1 als XbaI/AvrII-Fragment eingesetzt. Der erhaltene Vektor wurde mit XhoI/EcoRI verdaut und mit
20 den jeweils aneinandergelagerten Promotoroligonukleotiden (PPHS1.1 und PPHS1.2 bzw. PPHS2.1 und PPHS2.2) ligiert. Der entstandene Vektor wurde XbaI verdaut und mit Hilfe von Klenow-Fragment aufgefüllt, dann KpnI verdaut und die Vektorbande ohne das Luziferase-Fragment isoliert. Zwei weitere aneinandergelagerte Oligonukleotide (PMCS1.1 PMCS1.2), die die Klonierungsstelle enthalten, wurden mit den so verdauten Vektoren ligiert.

2. Klonierung von bioS1 (ECU29581_24, SEQ ID No. 1)

Das Gen, das für BioS1 kodiert, wurde aus dem Chromosom von E. coli durch eine PCR-Reaktion amplifiziert, mit optimierten Translationssignalen versehen und in einen Vektor kloniert, der eine Überexpression des Gens in E. coli Stämmen ermöglicht.

a) Entwicklung von Oligonukleotiden zur Amplifizierung des bioS1 Gens aus dem E. coli Chromosom

BioS1 soll als Expressionskassette bestehend aus einer ribosomalen Bindungsstelle, dem Startkodon der kodierenden Sequenz und dem Stopkodon zwischen zwei Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme amplifiziert werden. Für beide
35 Restriktionsschnittstellen wurde die Erkennungssequenz von MluI gewählt. Das bioS1 Gen wurde mit Hilfe der Oligonukleotide PbioS1.1 (5'-CGCACGCGTGAGGAGTACCATGAACGT-3') und pbioS1.2 (5'-CGCACGCGTT-TAATCCACCAATAATT-3') kloniert.

Durchführung der PCR

Bedingungen

Als Matrize wurden 0,5 µg chromosomale DNA von E. coli W3110 verwendet. Die Oligonukleotide PbioS1.1 und PbioS1.2 wurden in einer Konzentration von je 15 pMol eingesetzt. Die Konzentration an dNTP's betrug 200 µM. Als
45 Polymerase wurden 2,5 U Pwo DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) im Reaktionspuffer des Herstellers eingesetzt. Das Volumen der PCR-Reaktion betrug 100 µl.

Amplifikationsbedingungen

50 Die Denaturierung der DNA erfolgte für 2 min bei 94°C. Anschließend wurden die Oligonukleotide für 30 sec bei 55°C angelagert.

Die Elongation erfolgte für 45 sec bei 72°C. Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen durchgeführt.

Das erhaltene DNA-Produkt mit einer Größe von 1200 bp wurde aufgereinigt und durch MluI im geeigneten Puffer verdaut.

55 5 µg des Vektors pHS1 wurden durch MluI verdaut und durch Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (Boehringer Mannheim) dephosphorylliert. Nach Denaturierung der SAP wurden Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1 : 3 durch den Rapid-DNA-Ligation Kit nach der Vorschrift des Herstellers ligiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in den Stamm E. coli XL-1-blue.

Positive Klone wurden durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse identifiziert. Die richtige Orientierung des bioS1-Fragments in pHS1 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestimmt. Das erhaltene Konstrukt wurde pHS1 bioS1 (Fig. 1) genannt. Die Sequenz von pHS1 bioS1 ist SEQ ID No. 5 zu entnehmen.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bioS1 im Vektor ist SEQ ID No. 6 zu entnehmen. 2 µg des Vektors pHS1 bioS1 wurden mit MluI verdaut und das Gen bioS1 durch ein Agarosegel isoliert. Der Vektor pHS2 wurde mit MluI verdaut mit SAP-Phosphatase dephosphorylliert und mit dem Fragment bioS1 zusammen in einer Ligation angesetzt. Der
65 Ligationsansatz wurde in XL-1-blue transformiert und positive Klone in der richtigen Orientierung durch Plasmidisolierung und Restriktionsverdau identifiziert. Der erhaltene Vektor wurde pHS2 bioS1 (Fig. 2) genannt. Die Sequenz von pHS2 bioS1 ist SEQ ID No. 9 zu entnehmen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bioS1 im Vektor ist SEQ ID No. 10 zu entnehmen.

3. Klonierung von bioS2 (SEQ ID No. 3)

Um in *E. coli* weitere Gene zu klonieren, die für Genprodukte kodieren die am Aufbau von Fe-S-Clustern beteiligt sind, wurde folgender Weg beschritten:

Ein Sequenzvergleich (Programm Megalign, Modus Clustal) von As-Sequenzen von Proteinen der Datenbank Swissprot/PIR mit einer hohen Homologie (> 40%) zum NifS Protein aus *A. vinelandii* zeigte, daß neben dem bereits beschriebenen Sequenzmotiv I auch der N-Terminus dieser Proteine eine signifikante Konservierung zeigt.

Als eine typische N-terminale konservierte Sequenz von Proteinen der NifS-Familie wurde die As-Sequenz mit der Sequenz MIYLDNXATT identifiziert und als Motiv II a bezeichnet.

Eine Analyse der Datenbank Swissprot/PIR auf eine Konservierung dieser Sequenz mit mehr als 80% zeigte ein weiteres Protein in *E. coli*. Von diesem Protein ist durch Edman-Abbau erhaltene N-terminale Sequenz von 11 As bekannt (Datenbankbezeichnung: UP06_Ecoli). Dieses Protein wurde als hypothetisches NifS-Homolog angesehen und in Analogie zu BioS1 als im folgenden als BioS2 bezeichnet.

Um das Gen für das Protein BioS2 zu klonieren und zu sequenzieren, wurde folgender Weg beschritten. Ausgehend von der Proteinsequenz HTU00072_10 wurde zum einen das konservierte Aminosäure-Motiv I zum anderen die oben genannte As-Sequenz von UP06_Ecoli benutzt, um degenerierte Oligonukleotide herzustellen, die in der Lage sind, ein Fragment des bioS2 Gens zu amplifizieren. Dafür wurden die beiden As-Motive HTU00072_10 (Motiv I) und UP06_Ecoli (Motiv II b, MKLPIYL.DYSAT) in die korrespondierenden DNA-Sequenzen revers translatiert. Aus dem Motiv II wurde so das degenerierte Oligonukleotid PbioS2.1 (5'-ATGAARYTNCNNATHTIAYYINGAYTAYWSNGCNAC-3') und aus dem Motiv I das degenerierte Oligonukleotid PbioS2.2 (5'-cccaghggrcrtgcagyttrtgrccrga-3') synthetisiert.

Durchführung der PCR-Reaktion

Als Matrice diente chromosomale DNA von *E. coli* W3110. Je 0,5 µg der Oligonukleotide Pbio2.1 und PbioS2.2 wurden mit je 15 pMol Nukleotidmix, 2,5 U Pwo DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) im Reaktionspuffer des Herstellers umgesetzt. Das Volumen der PCR-Reaktion betrug 100 µl.

Amplifikationsbedingungen

Die Denaturierung erfolgte für 2 min bei 94°C. Die Anlagerung der Oligonukleotide wurde bei 45°C, die Elongation für 45 sec bei 72°C durchgeführt. Die PCR wurde über 30 Zyklen durchgeführt. Durch die PCR konnten drei Fragmente selektiv amplifiziert werden, von denen eines die aus den Sequenzvergleichen erwartete Größe von 600 bp hatte. Dieses DNA-Fragment wurde durch Agarosegel-Aufreinigung isoliert und mit dem Oligonukleotid PbioS2.2 sequenziert. Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in allen sechs möglichen Leserastern translatiert. Die erhaltenen translatierten As-Sequenzen wurden dann mit der translatierten AS-Sequenz von HTU00072_10 bzw. NifS aus *A. vinelandii* verglichen. Eines der translatierten Leseraster zeigt eine hohe Homologie mit der As-Sequenz des beschriebenen ORF HTU00072 10 und mit bioS2 bezeichnet.

Um die gesamte DNA-Sequenz von bioS2 (= SEQ ID No. 3) zu bestimmen und zu klonieren, wurde folgender Weg beschritten:

Zuerst wurde eine markierte DNA-Sonde hergestellt, die zu bioS2 homolog ist. Dies geschah mit Hilfe des PCR-DIG-Labeling-Kit (Boehringer Mannheim). Als Matrice für die Herstellung der DIG-DNA-Sonde diente das beschriebene PCR-Produkt, das durch die Oligonukleotide PbioS2.1 und PbioS2.2 hergestellt wurde.

Die Bedingungen der PCR waren

Einsatz: 1 µl der PCR-Matrice, 5 µl Nukleotid-DIG-dUTP-Mix, je 15 pMol Oligonukleotid PbioS2.1 und PbioS2.2, Puffer des Kits mit 1,75 mM MgCl₂ 0,75 µl Expand-Polymerase-Mix (Boehringer Mannheim).

Amplifikationsbedingungen

Aufschmelzen der DNA bei 94°C für 2 min, Aufschmelzen der DNA 10 sec bei 94°C, Annealing 30 sec bei 45°C, Elongation 3.30 min bei 68°C über 10 Zyklen, Aufschmelzen der DNA 10 sec bei 94°C, Annealing 30 sec bei 45°C, Elongation 3.30 min bei 68°C, Verlängerung der Elongation für 20 sec pro Zyklus über 20 Zyklen. Aufreinigung des DIG-markierten Fragments durch PCR-Purification Kit.

4. Southern-Analyse von bioS2 mit chromosomaler DNA

In weiteren Schritten wurde genomische DNA durch Restriktionsenzyme verdaut und durch Southern-Hybridisierung mit Hilfe der markierten DNA-Sonde analysiert.

Chromosomale *E. coli* DNA W3110 (10 µg) wurde mit den folgenden Restriktionsenzymen vollständig verdaut: EcoRI, BamHI, Acc65I, HindIII, SalI. Das Volumen der Ansätze betrug 50 µl; die Enzymmenge je 30 U. Die Ansätze wurden 4 h inkubiert. Die derart verdaute DNA wurden durch ein 1% Agarosegel in TBE-Puffer (Sambrook, J. Fritsch, E. F. Maniatis, T. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989, ISBN 0-87969-373-8) aufgetrennt und mit Hilfe einer Druckübertragungskammer (Stratagene) auf eine Nylon-Membran (Boehringer Mannheim) übertragen und durch UV-Strahlung (Stratalinker, Stratagene) kovalent an der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der DIG-markierten DNA-Sonde in DIG-Easyhyb Puffer (Boehringer Mannheim) bei 65°C für 15 h. Die Entwicklung des Blots nach Anweisungen des Hersteller zeigt Hybridisierung der BioS2-DIG-DNA-Sonde mit Banden, die mit Größen von ca.

3-4 kb im Fall von Acc65I, EcoRI und HindIII bestimmt wurden. BamHI verdaute DNA zeigte eine Hybridisierung mit der bioS2-Sonde mit einem Fragment eines wesentlich höheren Molekulargewichts. Zur weiteren Klonierung wurden Fragmente von 3-4 kb bevorzugt weiter bearbeitet.

Klonierung von bioS2 durch inverse PCR

Im Fall des EdoRI-Verdaus wurde ein Fragment von ca. 4 kb identifiziert, das das gesuchte Gen trägt. Das gesamte Gen wurde dann durch die Technik der inversen PCR amplifiziert und kloniert. Im ersten Schritt der inversen PCR wurde chromosomale E. coli DNA durch EcoRI vollständig verdaut. Im zweiten Schritt wurde dann die EcoRI verdaute DNA bei geringen DNA-Konzentrationen (ca. 20 ng/ml) aus dem vorher beschriebenen Restriktionsverdau durch Ligase kovalent ligiert, unter Bedingungen unter denen statistisch gesehen eine intramolekulare Verknüpfung erfolgt. Im dritten Schritt wurde dann eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei der Oligonukleotide eingesetzt werden, deren Sequenz spezifisch für das gesuchte Zielgen ist.

Spezifisch amplifizierte DNA-Segmente können anhand ihrer Größe identifiziert werden, die sich aus der Größe des Restriktionsfragments aus der Southern-Analyse und aus der Lokalisierung der Oligonukleotide im bekannten Abschnitt des Gens ergibt. Derart identifizierte Fragmente werden dann in einen geeigneten Vektor wie pBS SK Bluescript/ pCR Script (Stratagene) kloniert und sequenziert.

Experimentelle Durchführung

1 µg chromosomale DNA aus dem Stamm W3110 wurde durch 15 U EcoRI (Boehringer Mannheim) in einem Volumen von 50 µl vollständig verdaut. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde durch Auftrag von 30 µl auf ein Agarosegel überprüft. Fragmente dieses Verdaus chromosomaler DNA (10 µl des Verdaus = 200 ng) wurden in einem Volumen von 100 µl zusammen mit 10 µl Ligationspuffer und 2 U T4-Ligase (Boehringer Mannheim) für 15 h bei 15°C inkubiert. (intramolekulare Ligationsreaktion). Nach der Ligationsreaktion wurde die T4-Ligase durch Inkubation bei 65°C für 20 min. inaktiviert. Von diesem Ligationsansatz wurden 5 µl als Matrize für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die Primer PbioS2.3 (5'-GCGTGGGTAAACTGCCATCGACCTGAGCC-3') und PbioS2.4 (5'-CTACGCTTCCCTCAGCCTGCCAGCCGAAA-3') wurden ausgehend von der Sequenz von bioS2 synthetisiert.

Oligonukleotid PbioS2.3 hybridisiert auf der 5'-Seite von bioS2 und bewirkt das die Elongation der Amplifikation der kodierenden Sequenz auf der 5'-Seite auf dem Gegenstrang in 3'-Richtung stattfindet.

Oligonukleotid PbioS2.4 hybridisiert auf der 3'-Seite von bioS2 und bewirkt das die Elongation der Amplifikation der kodierenden Sequenz auf der 3'-Seite auf dem kodierenden Strang in 3'-Richtung stattfindet.

Einsatz: 5 µl des Ligationsansatz, 1.75 µl Desoxynukleotid-Mischung (350 µmol, Boehringer Mannheim), je 15 pMol Oligonukleotid PbioS2.5 und PbioS2.6, Puffer 1 des Kits mit 1.75 mM MgCl₂ 0.75 µl Expand-Polymerase-Mix.

Bedingungen für die Amplifikation der ligierten E. coli DNA mit Primer PbioS2.3/ PbioS2.4. Expand-Kit (Boehringer Mannheim) Aufschmelzen der DNA 2 min bei 94°C. Aufschmelzen der DNA 10 sec bei 94°C, Annealing 30 sec bei 61°C, Elongation 3.30 min bei 68°C über 10 Zyklen. Aufschmelzen der DNA 10 sec bei 94°C, Annealing 30 sec bei 61°C, Elongation 3.30 min bei 68°C. Verlängerung der Elongation für 20 sec pro Zyklus über 20 Zyklen.

Durch die beschriebene Amplifikation wurde ein PCR-Produkt von ca. 3 kb erhalten. Dieses DNA-Fragment zeigte in einer Southern-Hybridisierung unter stringenten Bedingungen eine deutliche Hybridisierung mit der bereits beschriebenen bioS2-DIG-DNA-Sonde.

Es wurde angenommen, daß dieses DNA-Fragment DNA-Sequenzen enthält, die zu bioS2 hochgradig homolog sind. Daher wurde dieses DNA-Fragment in einen Vektor kloniert, um es weiter zu charakterisieren und zu sequenzieren. Das DNA-Fragment wurde mit dem pCR-Skript Kit (Stratagene) zuerst laut Anweisung des Herstellers mit Pfu-Polymerase behandelt und dann in den Vektor pCR Skript ligiert. Der Ligationsansatz wurde in x1.-1-blue Zellen (Stratagene) transformiert und auf LB-Amp ausplattiert. Ein positiver Klon, der ein Fragment trug, wurde durch Minipräparationsanalyse identifiziert. Die Sequenzierung ergab die in SEQ ID No. 3 wiedergegebene Gesamtsequenz (= bioS2).

BioS2 wurde dann als Expressionskassette analog zu bioS1 amplifiziert und kloniert. Dafür wurden dem Gen durch PCR mit den Oligonukleotiden PbioS2.5 (5'-CATGACGCGTAAAGAGGAGAAATTAAGTATGAAAT-TACCGATTATTTGG-3') und PbioS2.6 (5'-GCGACGCGTGATTAAATGATGAGCCCAT-3') eine Erkennungsstelle für MluI und eine optimierte Shine-Dalgarno-Sequenz auf der 5'Seite und eine Erkennungsstelle für MluI auf der 3'Seite zugefügt.

Durchführung der PCR

Als Matrize wurden 0.5 µg chromosomale DNA von W3110 eingesetzt.

Die Oligonukleotide PbioS2.5 und PbioS2.6 wurden in einer Konzentration von je 15 pMol eingesetzt. Die Konzentration an dNTP's betrug 200 µM. Als Polymerase wurden 2.5 U Pwo DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) im Reaktionspuffer des Herstellers eingesetzt. Das Volumen der PCR-Reaktion betrug 100 µl.

Amplifikationsbedingungen

Denaturierung 2 sec bei 94°C. Anlagern der Oligonukleotide für 30 sec bei 55°C. Elongation für 45 sec bei 72°C. Die PCR wurde über 30 Zyklen durchgeführt.

Das erhaltene DNA-Produkt der richtigen Größe von ca. 1200 bp wurde durch den PCR-Purification-Kit (Boehringer Mannheim) aufgereinigt und durch MluI im geeigneten Puffer verdaut.

5 µg des Vektors pHS2 wurden durch MluI verdaut und durch Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Nach Denaturierung der SAP wurden Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis

von 1 : 3 durch den Rapid-DNA-Ligation Kit nach der Vorschrift des Herstellers ligiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in den Stamm XL-1-blue. Positive Klone wurden durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse identifiziert. Die richtige Orientierung des bioS2-Fragments in pHS2 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestimmt. Der Vektor wurde mit pHS2 bioS2 (Fig. 3) bezeichnet. Die Sequenz von pHS2 bioS2 ist SEQ ID No. 11 zu entnehmen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bioS2 im Vektor ist SEQ ID No. 12 zu entnehmen. Analog wurde die Klonierung von bioS2 in den Vektor pHS1 vorgenommen. Die Sequenz von pHS1 bioS2 ist SEQ ID No. 7 zu entnehmen (Fig. 4). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bioS2 im Vektor ist SEQ ID No. 8 zu entnehmen.

5. Konstruktion des Plasmids pHBbio14

Die in vivo-Klonierung des Bio-Operons wurde durch einen transduzierenden Lambda-Phagen durchgeführt. Die Selektion von Lambda bio⁺ Phagen erfolgte durch die Transduktion eines E. coli bionegativen Stammes zu bio⁺. Der isolierte bio⁺ transduzierende Lambda Phage wurde propagiert und die Lambda DNA aufgereinigt. Es folgte die Excision eines 8,7 kb EcoRI/HinDIII-Fragments mit dem gesamten Biotin-Operon aus der Lambda-Phagen DNA und Ligation des Fragments in pBR322, der EcoRI/HinDIII geschnitten worden war. Positive Klone wurden durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse identifiziert.

Deletion eines 1,2 Kb Fragments 3' von bioD

Nicht benötigte Gensequenzen auf der 3'-Seite des bioD Gens wurden entfernt. Dafür wurde durch PCR-Reaktion hinter dem Stopkodon von bioD eine EcoRI-Schnittstelle eingebaut. Die Entwicklung der Oligonukleotide Pbio1.1 (5'-AA-TAAGGAATTC-TTATGTACTTTCCGGTTGCGG-3') und Pbio1.2 (5'-AACAGCAGCCTGCAGCTGGATTA-3') für diese PCR-Reaktion erfolgte nach der Operon-Sequenz von Otsuka et al. (J. Biol. Chem. 263, 1988 : 19577-85).

PCR-Bedingungen

2,5 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer) und je 15 pmol Primer wurden in einem Volumen von 100 µl umgesetzt. Das Annealing wurde bei 50°C und die Elongation für 1 min bei 72°C über 30 Zyklen durchgeführt. Isolierung und Aufreinigung eines 488 bp-Fragments erfolgte über Agarose-Gel. Verdau des erhaltenen Fragments mit EcoRI/PstI. Verdau von pHBbio1 mit EcoRI/PstI. Isolierung eines 9,5 kb Fragments.

Das 9,5 kb Fragments wurde mit dem 488 bp Fragments ligiert und in xL1-blue-Zellen transformiert. Erhaltene Klone wurden durch Plasmidpräparation und durch Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA mit den Enzymen EcoRI und HinDIII analysiert, positive Klone, die ein 5,9 kb Fragment trugen, wurden identifiziert. Es wurde ein Klon, der mit pHBbio2 bezeichnet wurde, isoliert. Von diesem Klon wurde Plasmid-DNA gewonnen. 5 µg pHBbio2 wurden mit EcoRI/HinDIII verdaut und das 5,9 kb Fragment isoliert, das die gesamten Biotin-Biosynthesegene enthielt.

5 µg des Plasmids pAT153 wurden mit EcoRI und HinDIII verdaut. Das erhaltene 5,9 kb Fragment mit den Biotin-Biosynthesegenen wurde mit dem verdauten Vektor pAT153 ligiert und in XL-1-blue transformiert. Erhaltene Klone wurden durch Plasmidpräparation und durch Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA mit den Enzymen EcoRI und HinDIII analysiert. Positive Klone wurden identifiziert und ein Klon mit der Bezeichnung pHbio14 isoliert.

6. Erhöhung der Biotin-Produktivität durch Überexpression von bioS1

Stamm BM4092 (Barker und Campbell) wurde durch eine P1-Transduktion mit Hilfe eines P1-Lysats, das auf einem recA::Tn10 tragendem Stamm gewachsen war, nach recA⁻ transduziert. Der Erfolg der Transduktion wurde durch eine erhöhte UV-Sensitivität der positiven Transduktanten nachgewiesen. Daraufhin wurde der erhaltene Stamm LU8091 mit dem Plasmid pHBbio14 nach der CaCl₂-Methode transformiert und auf LB-Ampizillin 100 µg/ml angezogen. Ein Klon wurde isoliert, und dieser wurde jeweils mit den Plasmiden pHS1 bioS1 und pHS2 bioS2 durch die CaCl₂-Methode transformiert und auf LB-Agar, Ampizillin 100 µg/ml und Kanamycin 25 µg/ml selektioniert.

Je eine Kolonie der jeweiligen Transformanten wurde in einer DYT-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotika angeimpft und für 12 h inkubiert. Die Übermalkkultur (= ÜNK) wurde eingesetzt um eine 10 ml Kultur in TB-Medium (Sambrook, J. Fritsch, E. F. Maniatis, T. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989 ISBN 0-87969-373-8) mit den entsprechenden Antibiotika anzuimpfen und über 24h Stunden angezogen. Nach Ende des Wachstums wurden die Zellen vom Kulturüberstand durch Zentrifugation abgetrennt und die Biotin- und Dethiobiotin-Konzentration durch einen ELISA mit Streptavidin und Avidin im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind Tabelle I zu entnehmen.

Tabelle I

Bestimmung der Biotin- und Dethiobiotinkonzentration

Stamm	Plasmid I	Plasmid II	Biotin mg/l	Dethiobiotin mg/l
Lu8091	pHBbio14		9,4	45,6
Lu8091	pHBbio14	pHS1 bioS1	15,3	19,7
Lu8091	pHBbio14	pHS2 bioS1	19,2	15,8

DE 197 31 274 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

5 (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl Bosch Strasse
- (C) ORT: Ludwigshafen
- 10 (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

15 (ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung von Biotin

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

20 (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- 25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

30 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1217 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- 35 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

40 (iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
- 45 (B) STAMM: W3110

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- 50 (B) LAGE: 1..11

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- 55 (B) LAGE: 12..1217

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

60 CGAGGAGTAC C ATG AAC GTT TTT AAT CCC GCG CAG TTT CGC GCC CAG TTT 50
Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe
1 5 10

DE 197 31 274 A 1

CCC GCA CTA CAG GAT GCG GGC GTC TAT CTC GAC AGC GCC GCG ACC GCG Pro Ala Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala 15 20 25	98	
CTT AAA CCT GAA GCC GTG GTT GAA GCC ACC CAA CAG TTT TAC AGT CTG Leu Lys Pro Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu 30 35 40 45	146	5
AGC GCC GGA AAC GTC CAT CGC AGC CAG TTT GCC GAA GCC CAA CGC CTG Ser Ala Gly Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu 50 55 60	194	10
ACC GCG CGT TAT GAA GCT GCA CGA GAG AAA GTG GCG CAA TTA CTG AAT Thr Ala Arg Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn 65 70 75	242	15
GCA CCG GAT GAT AAA ACT ATC GTC TGG ACG CGC GGC ACC ACT GAA TCC Ala Pro Asp Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser 80 85 90	290	20
ATC AAC ATG GTG GCA CAA TGC TAT GCG CGT CCG CGT CTG CAA CCG GGC Ile Asn Met Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly 95 100 105	338	25
GAT GAG ATT ATT GTC AGC GTG GCA GAA CAC CAC GCC AAC CTC GTC CCC Asp Glu Ile Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro 110 115 120 125	386	30
TGG CTG ATG GTC GCC CAA CAA ACT GGA GCC AAA GTG GTG AAA TTG CCG Trp Leu Met Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro 130 135 140	434	35
CTT AAT GCG CAG CGA CTG CCG GAT GTC GAT TTG TTG CCA GAA CTG ATT Leu Asn Ala Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile 145 150 155	482	40
ACT CCC CGT AGT CGG ATT CTG GCG TTG GGT CAG ATG TCG AAC GTT ACT Thr Pro Arg Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr 160 165 170	530	45
GGC GGT TGC CCG GAT CTG GCG CGA GCG ATT ACC TTT GCT CAT TCA GCC Gly Gly Cys Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala 175 180 185	578	50
GGG ATG GTG GTG ATG GTT GAT GGT GCT CAG GGG GCA GTG CAT TTC CCC Gly Met Val Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro 190 195 200 205	626	55
GCG GAT GTT CAG CAA CTG GAT ATT GAT TTC TAT GCT TTT TCA GGT CAC Ala Asp Val Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His 210 215 220	674	60

DE 197 31 274 A 1

5	AAA CTG TAT GGC CCG ACA GGT ATC GGC GTG CTG TAT GGT AAA TCA GAA Lys Leu Tyr Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu 225 230 235	722
10	CTG CTG GAG GCG ATG TCG CCC TGG CTG GGC GGC GGC AAA ATG GTT CAC Leu Leu Glu Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His 240 245 250	770
15	GAA GTG AGT TTT GAC GGC TTC ACG ACT CAA TCT GCG CCG TGG AAA CTG Glu Val Ser Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu 255 260 265	818
20	GAA GCT GGA ACG CCA AAT GTC GCT GGT GTC ATA GGA TTA AGC GCG GCG Glu Ala Gly Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala 270 275 280 285	866
25	CTG GAA TGG CTG GCA GAT TAC GAT ATC AAC CAG GCC GAA AGC TGG AGC Leu Glu Trp Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser 290 295 300	914
30	CGT AGC TTA GCA ACG CTG GCG GAA GAT GCG CTG GCG AAA CGT CCC GGC Arg Ser Leu Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly 305 310 315	962
35	TTT CGT TCA TTC CGC TGC CAG GAT TCC AGC CTG CTG GCC TTT GAT TTT Phe Arg Ser Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe 320 325 330	1010
40	GCT GGC GTT CAT CAT AGC GAT ATG GTG ACG CTG CTG GCG GAG TAC GGT Ala Gly Val His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly 335 340 345	1058
45	ATT GCC CTG CGG GCC GGG CAG CAT TGC GCT CAG CCG CTA CTG GCA GAA Ile Ala Leu Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu 350 355 360 365	1106
50	TTA GGC GTA ACC GGC ACA CTG CGC GCC TCT TTT GCG CCA TAT AAT ACA Leu Gly Val Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr 370 375 380	1154
55	AAG ACT GAT GTG GAT GCG CTG GTG AAT GCC GTT GAC CGC GCG CTG GAA Lys Ser Asp Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu 385 390 395	1202
60	TTA TTG GTG GAT TA Leu Leu Val Asp 400	1217

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 401-Aminosäuren

DE 197 31 274 A 1

(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Asn	Val	Phe	Asn	Pro	Ala	Gln	Phe	Arg	Ala	Gln	Phe	Pro	Ala	Leu	10
1				5					10					15		
Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Leu	Asp	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Lys	Pro	15
		20						25					30			
Glu	Ala	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Gln	Gln	Phe	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	20
		35					40					45				
Asn	Val	His	Arg	Ser	Gln	Phe	Ala	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Thr	Ala	Arg	25
	50					55					60					
Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Pro	Asp	25
65					70					75				80		
Asp	Lys	Thr	Ile	Val	Trp	Thr	Arg	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Ile	Asn	Met	30
				85					90					95		
Val	Ala	Gln	Cys	Tyr	Ala	Arg	Pro	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Glu	Ile	35
		100						105					110			
Ile	Val	Ser	Val	Ala	Glu	His	His	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Trp	Leu	Met	35
	115						120					125				
Val	Ala	Gln	Gln	Thr	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Leu	Asn	Ala	40
	130					135					140					
Gln	Arg	Leu	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Ile	Thr	Pro	Arg	45
145					150					155				160		
Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Cys	45
			165						170					175		
Pro	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Phe	Ala	His	Ser	Ala	Gly	Met	Val	50
		180						185					190			
Val	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Val	His	Phe	Pro	Ala	Asp	Val	55
	195						200					205				
Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Leu	Tyr	60
	210					215					220					
Gly	Pro	Thr	Gly	Ile	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Glu	60
225					230				235					240		
Ala	Met	Ser	Pro	Trp	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Val	His	Glu	Val	Ser	65
				245					250					255		

DE 197 31 274 A 1

Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly
 260 265 270
 5 Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp
 275 280 285
 10 Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu
 290 295 300
 Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser
 15 305 310 315 320
 Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val
 325 330 335
 20 His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu
 340 345 350
 Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val
 25 355 360 365
 Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
 30 370 375 380
 Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
 385 390 395 400
 35 Asp

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- 40 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 1233 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 45 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
 50 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iii) ANTISENSE: NEIN
 55 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
 (B) STAMM: W3110
 60 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 19..1233

65

DE 197 31 274 A 1

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LAGE: 1..18

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AAAGAGGAGA AATTAACT ATG AAA TTA CCG ATT TAT CTC GAC TAC TCC GCA	51
Met Lys Leu Pro Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala	10
1 5 10	
ACC ACG CCG GTG GAC CCG CGT GTT GCC GAG AAA ATG ATG CAG TTT ATG	99
Thr Thr Pro Val Asp Pro Arg Val Ala Glu Lys Met Met Gln Phe Met	15
15 20 25	
ACG ATG GAC GGA ACC TTT GGT AAC CCG GCC TCC CGT TCT CAC CGT TTC	147
Thr Met Asp Gly Thr Phe Gly Asn Pro Ala Ser Arg Ser His Arg Phe	20
30 35 40	
GGC TGG CAG GCT GAA GAA GCG GTA GAT ATC GCC CGT AAT CAG ATT GCC	195
Gly Trp Gln Ala Glu Glu Ala Val Asp Ile Ala Arg Asn Gln Ile Ala	25
45 50 55	
GAT CTG GTC GGC GCT GAT CCG CGT GAA ATC GTC TTT ACC TCT GGT GCA	243
Asp Leu Val Gly Ala Asp Pro Arg Glu Ile Val Phe Thr Ser Gly Ala	30
60 65 70 75	
ACC GAA TCT GAC AAC CTG GCG ATC AAA GGT GCA GCC AAC TTT TAT CAG	291
Thr Glu Ser Asp Asn Leu Ala Ile Lys Gly Ala Ala Asn Phe Tyr Gln	35
80 85 90	
AAA AAA GGC AAG CAC ATC ATC ACC AGC AAA ACC GAA CAC AAA GCG GTA	339
Lys Lys Gly Lys His Ile Ile Thr Ser Lys Thr Glu His Lys Ala Val	40
95 100 105	
CTG GAT ACC TGC CGT CAG CTG GAG CGC GAA GGT TTT GAA GTC ACC TAC	387
Leu Asp Thr Cys Arg Gln Leu Glu Arg Glu Gly Phe Glu Val Thr Tyr	45
110 115 120	
CTG GCA CCG CAG CGT AAC GGC ATT ATC GAC CTG AAA GAA CTT GAA GCA	435
Leu Ala Pro Gln Arg Asn Gly Ile Ile Asp Leu Lys Glu Leu Glu Ala	50
125 130 135	
GCG ATG CGT GAC GAC ACC ATC CTC GTG TCC ATC ATG CAC GTA AAT AAC	483
Ala Met Arg Asp Asp Thr Ile Leu Val Ser Ile Met His Val Asn Asn	55
140 145 150 155	
GAA ATC GGC GTG GTG CAG GAT ATC GCG GCT ATC GGC GAA ATG TGC CGT	531
Glu Ile Gly Val Val Gln Asp Ile Ala Ala Ile Gly Glu Met Cys Arg	60
160 165 170	
GCT CGT GGC ATT ATC TAT CAC GTT GAT GCA ACC CAG AGC GTG GGT AAA	579
Ala Arg Gly Ile Ile Tyr His Val Asp Ala Thr Gln Ser Val Gly Lys	65
175 180 185	

DE 197 31 274 A 1

	CTG CCT ATC GAC CTG AGC CAG TTG AAA GTT GAC CTG ATG TCT TTC TCC	627
	Leu Pro Ile Asp Leu Ser Gln Leu Lys Val Asp Leu Met Ser Phe Ser	
5	190 195 200	
	GGT CAC AAA ATC TAT GGC CCG AAA GGT ATC GGT GCG CTG TAT GTA CGT	675
	Gly His Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg	
10	205 210 215	
	CGT AAA CCG CGC GTA CGC ATC GAA GCG CAA ATG CAC GGC GGC GGT CAC	723
	Arg Lys Pro Arg Val Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His	
15	220 225 230 235	
	GAG CGC GGT ATG CGT TCC GGC ACT CTG CCT GTT CAC CAG ATC GTC GGA	771
	Glu Arg Gly Met Arg Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly	
20	240 245 250	
	ATG GGC GAG GCC TAT CGC ATC GCA AAA GAA GAG ATG GCG ACC GAG ATG	819
	Met Gly Glu Ala Tyr Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met	
25	255 260 265	
	GAA CGT CTG CGC GGC CTG CGT AAC CGT CTG TGG AAC GGC ATC AAA GAT	867
	Glu Arg Leu Arg Gly Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp	
30	270 275 280	
	ATC GAA GAA GTT TAC CTG AAC GGT GAC CTG GAA CAC GGT GCG CCG AAC	915
	Ile Glu Glu Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn	
35	285 290 295	
	ATT CTC AAC GTC AGC TTC AAC TAC GTT GAA GGT GAG TCG CTG ATT ATG	963
	Ile Leu Asn Val Ser Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met	
40	300 305 310 315	
	GCG CTG AAA GAC CTC GCA GTT TCT TCA GGT TCC GCC TGT ACG TCA GCA	1011
	Ala Leu Lys Asp Leu Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala	
45	320 325 330	
	AGC CTC GAA CCG TCC TAC GTG CTG CGC GCG CTG GGG CTG AAC GAC GAG	1059
	Ser Leu Glu Pro Ser Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu	
50	335 340 345	
	CTG GCA CAT AGC TCT ATC CGT TTC TCT TTA GGT CGT TTT ACT ACT GAA	1107
	Leu Ala His Ser Ser Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu	
55	350- 355 360	
	GAA GAG ATC GAC TAC ACC ATC GAG TTA GTT CGT AAA TCC ATC GGT CGT	1155
	Glu Glu Ile Asp Tyr Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg	
60	365 370 375	
	CTG CGT GAC CTT TCT CCG CTG TGG GAA ATG TAC AAG CAG GGC GTG GAT	1203
	Leu Arg Asp Leu Ser Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp	
	380 385 390 395	

DE 197 31 274 A 1

CTG AAC AGC ATC GAA TGG GCT CAT CAT TA
 Leu Asn Ser Ile Glu Trp Ala His His
 400 405

1233

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 404 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Lys	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Ser	Ala	Thr	Thr	Pro	Val	Asp		
1				5					10					15			
Pro	Arg	Val	Ala	Glu	Lys	Met	Met	Gln	Phe	Met	Thr	Met	Asp	Gly	Thr		
			20					25					30				
Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Arg	Phe	Gly	Trp	Gln	Ala	Glu		
		35					40					45					
Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Ala	Arg	Asn	Gln	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	Gly	Ala		
		50				55					60						
Asp	Pro	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Glu	Ser	Asp	Asn		
		65			70					75					80		
Leu	Ala	Ile	Lys	Gly	Ala	Ala	Asn	Phe	Tyr	Gln	Lys	Lys	Gly	Lys	His		
			85						90					95			
Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Glu	His	Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Cys	Arg		
			100					105					110				
Gln	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Glu	Val	Thr	Tyr	Leu	Ala	Pro	Gln	Arg		
		115					120					125					
Asn	Gly	Ile	Ile	Asp	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Met	Arg	Asp	Asp		
		130				135					140						
Thr	Ile	Leu	Val	Ser	Ile	Met	His	Val	Asn	Asn	Glu	Ile	Gly	Val	Val		
145					150				155					160			
Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Met	Cys	Arg	Ala	Arg	Gly	Ile	Ile		
			165					170						175			
Tyr	His	Val	Asp	Ala	Thr	Gln	Ser	Val	Gly	Lys	Leu	Pro	Ile	Asp	Leu		
			180					185					190				
Ser	Gln	Leu	Lys	Val	Asp	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Ile	Tyr		
		195					200					205					

65

DE 197 31 274 A 1

Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val
 210 215 220
 5 Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg
 225 230 235 240
 10 Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr
 245 250 255
 Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly
 260 265 270
 15 Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr
 275 280 285
 20 Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser
 290 295 300
 Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu
 25 305 310 315 320
 Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser
 325 330 335
 30 Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser
 340 345 350
 35 Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr
 355 360 365
 Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser
 40 370 375 380
 Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu
 385 390 395 400
 45 Trp Ala His His

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 3794 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

DE 197 31 274 A 1

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pHS1bioS1

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 601..1806

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GACGTCTGTG TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTCACAC AGGGCCCTCG GACACCGAGG	60
AGAATGTCAA GAGGCGAACA CACAACGTCT TGAGCGCCA GAGGAGGAAC GAGCTAAAC	120
GGAGCTTTTT TGCCCTGCGT GACCAGATCC CGGAGTTGGA AAACAATGAA AAGGCCCCCA	180
AGGTAGTTAT CCTTAAAAA GCCACAGCAT ACATCCTGTC CGTCCAAGCA GAGGAGCAAA	240
AGCTCATTTT TGAAGAGGAC TTGTTGCGGA AACGACGAGA ACAGTTGAAA CACAAACTTG	300
AACAGCTACG GAACTCTTGT GCGTAAGGAA AAGTAAGGAA AACGATTCCT TCTAACAGAA	360
ATGTCCTGAG CAATCACCTA TGAACGTGTC ACTCGAGATA GCATTTTTAT CCATAAGATT	420
AGCCGATCCT AAGGTTTACA ATTGTGAGCG CTCACAATTA TGATAGATTC AATTGTGAGC	480
GGATAACAAT TTCACACACG CTAGCGGTAC CGGGCCCCC CTCGAGGTCG ACGGTATCGA	540
TAAGCTTGAT ATCGAATTCC TGCAGCCCGG GGGATCCCAT GGTACGCGTC GAGGAGTACC	600
ATG AAC GTT TTT AAT CCC GCG CAG TTT CGC GCC CAG TTT CCC GCA CTA	648
Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu	35
1 5 10 15	
CAG GAT GCG GGC GTC TAT CTC GAC AGC GCC GCG ACC GCG CTT AAA CCT	696
Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro	40
20 25 30	
GAA GCC GTG GTT GAA GCC ACC CAA CAG TTT TAC AGT CTG AGC GCC GGA	744
Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly	45
35 40 45	
AAC GTC CAT CGC AGC CAG TTT GCC GAA GCC CAA CGC CTG ACC GCG CGT	792
Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg	50
50 55 60	
TAT GAA GCT GCA CGA GAG AAA GTG GCG CAA TTA CTG AAT GCA CCG GAT	840
Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp	55
65 70 75 80	
GAT AAA ACT ATC GTC TGG ACG CGC GGC ACC ACT GAA TCC ATC AAC ATG	888
Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met	60
85 90 95	

DE 197 31 274 A 1

5	GTG GCA CAA TGC TAT GCG CGT CCG CGT CTG CAA CCG GGC GAT GAG ATT	936
	Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile	
	100 105 110	
10	ATT GTC AGC GTG GCA GAA CAC CAC GCC AAC CTC GTC CCC TGG CTG ATG	984
	Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met	
	115 120 125	
15	GTC GCC CAA CAA ACT GGA GCC AAA GTG GTG AAA TTG CCG CTT AAT GCG	1032
	Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala	
	130 135 140	
20	CAG CGA CTG CCG GAT GTC GAT TTG TTG CCA GAA CTG ATT ACT CCC CGT	1080
	Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg	
	145 150 155 160	
25	AGT CCG ATT CTG GCG TTG GGT CAG ATG TCG AAC GTT ACT GGC GGT TGC	1128
	Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys	
	165 170 175	
30	CCG GAT CTG GCG CGA GCG ATT ACC TTT GCT CAT TCA GCC GGG ATG GTG	1176
	Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val	
	180 185 190	
35	GTG ATG GTT GAT GGT GCT CAG GGG GCA GTG CAT TTC CCC GCG GAT GTT	1224
	Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val	
	195 200 205	
40	CAG CAA CTG GAT ATT GAT TTC TAT GCT TTT TCA GGT CAC AAA CTG TAT	1272
	Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr	
	210 215 220	
45	GGC CCG ACA GGT ATC GGC GTG CTG TAT GGT AAA TCA GAA CTG CTG GAG	1320
	Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu	
	225 230 235 240	
50	GCG ATG TCG CCC TGG CTG GGC GGC GGC AAA ATG GTT CAC GAA GTG AGT	1368
	Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser	
	245 250 255	
55	TTT GAC GGC TTC ACG ACT CAA TCT GCG CCG TGG AAA CTG GAA GCT GGA	1416
	Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly	
	260 265 270	
60	ACG CCA AAT GTC GCT GGT GTC ATA GGA TTA AGC GCG GCG CTG GAA TGG	1464
	Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp	
	275 280 285	
65	CTG GCA GAT TAC GAT ATC AAC CAG GCC GAA AGC TGG AGC CGT AGC TTA	1512
	Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu	
	290 295 300	

DE 197 31 274 A 1

GCA ACG CTG GCG GAA GAT GCG CTG GCG AAA CGT CCC GGC TTT CGT TCA Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser 305 310 315 320	1560	
TTC CGC TGC CAG GAT TCC AGC CTG CTG GCC TTT GAT TTT GCT GGC GTT Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val 325 330 335	1608	5
CAT CAT AGC GAT ATG GTG ACG CTG CTG GCG GAG TAC GGT ATT GCC CTG His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu 340 345 350	1656	10
CGG GCC GGG CAG CAT TGC GCT CAG CCG CTA CTG GCA GAA TTA GGC GTA Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val 355 360 365	1704	15
ACC GGC ACA CTG CGC GCC TCT TTT GCG CCA TAT AAT ACA AAG AGT GAT Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp 370 375 380	1752	20
GTG GAT GCG CTG GTG AAT GCC GTT GAC CGC GCG CTG GAA TTA TTG GTG Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val 385 390 395 400	1800	25
GAT TAAACGCGTG CTAGAGGCAT CAAATAAAAC GAAAGGCTCA GTCGAAAGAC Asp	1853	30
TGGGCCTTTC GTTTTATCTG TTGTTTGTCTG GTGAACGCTC TCCTGAGTAG GACAAATCCG	1913	35
CCGCCCTAGA CCTAGGGGAT ATATTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT ACGCTCGGTC	1973	
GTTCGACTGC GCGGAGCGGA AATGGCTTAC GAACGGGGCG GAGATTTTCCT GGAAGATGCC	2033	40
AGGAAGATAC TTAACAGGGA AGTGAGAGGG CCGCGGCAAA GCCGTTTTTC CATAGGCTCC	2093	
CCCCCCTGA CAAGCATCAC GAAATCTGAC GCTCAAATCA GTGGTGGCGA AACCCGACAG	2153	
GA CTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GCGGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCCTG	2213	45
CCTTTCGGTT TACCGGTGTC ATTCCGCTGT TATGGCCGCG TTTGTCTCAT TCCACGCCCTG	2273	
ACACTCAGTT CCGGGTAGGC AGTTCGCTCC AAGCTGGACT GTATGCACGA ACCCCCCGTT	2333	50
CAGTCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGAAAGACAT	2393	
GCAAAAGCAC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AATTGATTTA GAGGAGTTAG TCTTGAAGTC	2453	
ATGCGCCGGT TAAGGCTAAA CTGAAAGGAC AAGTTTTGGT GACTGCGCTC CTCCAAGCCA	2513	55
GTTACCTCGG TTCAAAGAGT TGGTAGCTCA GAGAACCCTC GAAAAACCGC CCTGCAAGGC	2573	
GGTTTTTTCG TTTTCAGAGC AAGAGATTAC GCGCAGACCA AAACGATCTC AAGAAGATCA	2633	60
TCTTATTAAT CAGATAAAAT ATTTCTAGAT TTCAGTGCAA TTTATCTCTT CAAATGTAGC	2693	

DE 197 31 274 A 1

ACCTGAAGTC AGCCCCATAC GATATAAGTT GTTACTAGTG CTTGGATTCT CACCAATAAA 2753
 AAACGCCCCG CGGCAACCGA GCGTTCTGAA CAAATCCAGA TGGAGTTCTG AGGTCATTAC 2813
 5 TGGATCTATC AACAGGAGTC CAAGCGAGCT CTGGAACCCC AGAGTCCCGC TCAGAAGAAC 2873
 TCGTCAAGAA GGCGATAGAA GGCGATGCGC TGCGAATCGG GAGCGGCGAT ACCGTAAAGC 2933
 10 ACCAGGAAGC GGTGAGCCCA TTCGCCGCCA AGCTCTTCAG CAATATCACG GGTAGCCAAC 2993
 GCTATGTCCT GATAGCGGTC CGCCACACCC AGCCGGCCAC AGTCGATGAA TCCAGAAAAG 3053
 15 CGGCCATTTT CCACCATGAT ATTGCGCAAG CAGGCATCGC CATGGGTCAC GACGAGATCC 3113
 TCGCCGTCGG GCATGCGCGC CTTGAGCCTG GCGAACAGTT CGGCTGGCGC GAGCCCCCTGA 3173
 TGCTCTTCGT CCAGATCATC CTGATCGACA AGACCGGCTT CCATCCGAGT ACGTGCTCGC 3233
 20 TCGATGCGAT GTTTCGCTTG GTGGTCAAT GGGCAGGTAG CCGGATCAAG CGTATGCAGC 3293
 CGCCGCATTG CATCAGCCAT GATGGATACT TTCTCGGCAG GAGCAAGGTG AGATGACAGG 3353
 25 AGATCCTGCC CCGGCACTTC GCCCAATAGC AGCCAGTCCC TTCCCGCTTC AGTGACAACG 3413
 TCGAGCACAG CTGCGCAAGG AACGCCCCTC GTGGCCAGCC ACGATAGCCG CGCTGCCTCG 3473
 30 TCCTGCAGTT CATTCAGGGC ACCGGACAGG TCGGTCTTGA CAAAAAGAAC CGGGCGCCCC 3533
 TGCGCTGACA GCCGGAACAC GGCGGCATCA GAGCAGCCGA TTGTCTGTTG TGCCAGTCA 3593
 TAGCCGAATA GCCTCTCCAC CCAAGCGGCC GGAGAACCTG CGTGCAATCC ATCTTGTTCA 3653
 35 ATCATGCGAA ACGATCCTCA TCCTGTCTCT TGATCAGATC TTGATCCCCT GCGCCATCAG 3713
 ATCCTTGGCG GCAAGAAAGC CATCCAGTTT ACTTTGCAGG GCTTCCCAAC CTTACCAGAG 3773
 40 GGCGCCCCAG CTGGCAATTC C 3794

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

45 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 401 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

55 Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
 60 20 25 30

DE 197 31 274 A 1

Glu	Ala	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Gln	Gln	Phe	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	
		35					40					45				
Asn	Val	His	Arg	Ser	Gln	Phe	Ala	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Thr	Ala	Arg	5
	50					55					60					
Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Pro	Asp	10
	65				70					75					80	
Asp	Lys	Thr	Ile	Val	Trp	Thr	Arg	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Ile	Asn	Met	
			85						90					95		15
Val	Ala	Gln	Cys	Tyr	Ala	Arg	Pro	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Glu	Ile	
			100					105					110			
Ile	Val	Ser	Val	Ala	Glu	His	His	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Trp	Leu	Met	20
		115					120					125				
Val	Ala	Gln	Gln	Thr	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Leu	Asn	Ala	
	130					135					140					25
Gln	Arg	Leu	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Ile	Thr	Pro	Arg	
145					150					155					160	30
Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Cys	
				165					170					175		
Pro	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Phe	Ala	His	Ser	Ala	Gly	Met	Val	
			180					185					190			35
Val	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Val	His	Phe	Pro	Ala	Asp	Val	
		195					200					205				40
Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Leu	Tyr	
	210					215					220					
Gly	Pro	Thr	Gly	Ile	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Glu	45
225					230					235					240	
Ala	Met	Ser	Pro	Trp	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Val	His	Glu	Val	Ser	
				245					250					255		50
Phe	Asp	Gly	Phe	Thr	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	Trp	Lys	Leu	Glu	Ala	Gly	
			260					265					270			55
Thr	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Glu	Trp	
		275					280					285				
Leu	Ala	Asp	Tyr	Asp	Ile	Asn	Gln	Ala	Glu	Ser	Trp	Ser	Arg	Ser	Leu	60
	290					295					300					
Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Leu	Ala	Lys	Arg	Pro	Gly	Phe	Arg	Ser	
305					310					315					320	65

DE 197 31 274 A 1

Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val
 325 330 335

5 His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu
 340 345 350

Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val
 10 355 360 365

Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
 370 375 380

15 Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
 385 390 395 400

20 Asp

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- 25 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 3810 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 30 (D) TOPOLOGIE: ringförmig
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
- 35 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 40 (B) CLON: pHS1bios2
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 45 (B) LÄGE: 608..1822
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GACGTCTGTG TGAATTGTG AGCGGATAAC AATTCACAC AGGGCCCTCG GACACCGAGG 60

50 AGAATGTCAA GAGGCGAACA CACAACGTCT TGGAGCGCCA GAGGAGGAAC GAGCTAAAAC 120

GGAGCTTTTT TGCCCTGCGT GACCAGATCC CGGAGTTGGA AAACAATGAA AAGGCCCCCA 180

55 AGGTAGTTAT CCTTAAAAA GCCACAGCAT ACATCCTGTC CGTCCAAGCA GAGGAGCAAA 240

AGCTCATTTT TGAAGAGGAC TTGTTGCGGA AACGACGAGA ACAGTTGAAA CACAACTTG 300

60 AACAGCTACG GAACTCTTGT GCGTAAGGAA AAGTAAGGAA AACGATTCCT TCTAACAGAA 360

ATGTCCTGAG CAATCACCTA TGAAGTTCG ACTCGAGATA GCATTTTAT CCATAAGATT 420

DE 197 31 274 A 1

AGCCGATCCT AAGGTTTACA ATTGTGAGCG CTCACAATTA TGATAGATTC AATTGTGAGC	480	
GGATAACAAT TTCACACACG CTAGCGGTAC CGGGCCCCC CTCGAGGTCG ACGGTATCGA	540	5
TAAGCTTGAT ATCGAATTCC TGCAECCCGG GGGATCCCAT GGTACGCGTA AAGAGGAGAA	600	
ATTAACT ATG AAA TTA CCG ATT TAT CTC GAC TAC TCC GCA ACC ACG CCG	649	
Met Lys Leu Pro Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Thr Thr Pro		10
1 5 10		
GTG GAC CCG CGT GTT GCC GAG AAA ATG ATG CAG TTT ATG ACG ATG GAC	697	
Val Asp Pro Arg Val Ala Glu Lys Met Met Gln Phe Met Thr Met Asp		15
15 20 25 30		
GGA ACC TTT GGT AAC CCG GCC TCC CGT TCT CAC CGT TTC GGC TGG CAG	745	
Gly Thr Phe Gly Asn Pro Ala Ser Arg Ser His Arg Phe Gly Trp Gln		20
35 40 45		
GCT GAA GAA GCG GTA GAT ATC GCC CGT AAT CAG ATT GCC GAT CTG GTC	793	
Ala Glu Glu Ala Val Asp Ile Ala Arg Asn Gln Ile Ala Asp Leu Val		25
50 55 60		
GGC GCT GAT CCG CGT GAA ATC GTC TTT ACC TCT GGT GCA ACC GAA TCT	841	
Gly Ala Asp Pro Arg Glu Ile Val Phe Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ser		30
65 70 75		
GAC AAC CTG GCG ATC AAA GGT GCA GCC AAC TTT TAT CAG AAA AAA GGC	889	
Asp Asn Leu Ala Ile Lys Gly Ala Ala Asn Phe Tyr Gln Lys Lys Gly		35
80 85 90		
AAG CAC ATC ATC ACC AGC AAA ACC GAA CAC AAA GCG GTA CTG GAT ACC	937	
Lys His Ile Ile Thr Ser Lys Thr Glu His Lys Ala Val Leu Asp Thr		40
95 100 105 110		
TGC CGT CAG CTG GAG CGC GAA GGT TTT GAA GTC ACC TAC CTG GCA CCG	985	
Cys Arg Gln Leu Glu Arg Glu Gly Phe Glu Val Thr Tyr Leu Ala Pro		
115 120 125		
CAG CGT AAC GGC ATT ATC GAC CTG AAA GAA CTT GAA GCA GCG ATG CGT	1033	45
Gln Arg Asn Gly Ile Ile Asp Leu Lys Glu Leu Glu Ala Ala Met Arg		
130 135 140		
GAC GAC ACC ATC CTC GTG TCC ATC ATG CAC GTA AAT AAC GAA ATC GGC	1081	50
Asp Asp Thr Ile Leu Val Ser Ile Met His Val Asn Asn Glu Ile Gly		
145 150 155		
GTG GTG CAG GAT ATC GCG GCT ATC GGC GAA ATG TGC CGT GCT CGT GGC	1129	55
Val Val Gln Asp Ile Ala Ala Ile Gly Glu Met Cys Arg Ala Arg Gly		
160 165 170		
ATT ATC TAT CAC GTT GAT GCA ACC CAG AGC GTG GGT AAA CTG CCT ATC	1177	60
Ile Ile Tyr His Val Asp Ala Thr Gln Ser Val Gly Lys Leu Pro Ile		
175 180 185 190		

DE 197 31 274 A 1

	GAC CTG AGC CAG TTG AAA GTT GAC CTG ATG TCT TTC TCC GGT CAC AAA	1225
	Asp Leu Ser Gln Leu Lys Val Asp Leu Met Ser Phe Ser Gly His Lys	
5	195 200 205	
	ATC TAT GGC CCG AAA GGT ATC GGT GCG CTG TAT GTA CGT CGT AAA CCG	1273
	Ile Tyr Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro	
10	210 215 220	
	CGC GTA CGC ATC GAA GCG CAA ATG CAC GGC GGC GGT CAC GAG CGC GGT	1321
	Arg Val Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly	
15	225 230 235	
	ATG CGT TCC GGC ACT CTG CCT GTT CAC CAG ATC GTC GGA ATG GGC GAG	1369
	Met Arg Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu	
20	240 245 250	
	GCC TAT CGC ATC GCA AAA GAA GAG ATG GCG ACC GAG ATG GAA CGT CTG	1417
	Ala Tyr Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu	
25	255 260 265 270	
	CGC GGC CTG CGT AAC CGT CTG TGG AAC GGC ATC AAA GAT ATC GAA GAA	1465
	Arg Gly Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu	
30	275 280 285	
	GTT TAC CTG AAC GGT GAC CTG GAA CAC GGT GCG CCG AAC ATT CTC AAC	1513
	Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn	
35	290 295 300	
	GTC AGC TTC AAC TAC GTT GAA GGT GAG TCG CTG ATT ATG GCG CTG AAA	1561
	Val Ser Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys	
40	305 310 315	
	GAC CTC GCA GTT TCT TCA GGT TCC GCC TGT ACG TCA GCA AGC CTC GAA	1609
	Asp Leu Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu	
45	320 325 330	
	CCG TCC TAC GTG CTG CGC GCG CTG GGG CTG AAC GAC GAG CTG GCA CAT	1657
	Pro Ser Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His	
50	335 340 345 350	
	AGC TCT ATC CGT TTC TCT TTA GGT CGT TTT ACT ACT GAA GAA GAG ATC	1705
	Ser Ser Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile	
55	355 360 365	
	GAC TAC ACC ATC GAG TTA GTT CGT AAA TCC ATC GGT CGT CTG CGT GAC	1753
	Asp Tyr Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp	
60	370 375 380	
	CTT TCT CCG CTG TGG GAA ATG TAC AAG CAG GGC GTG GAT CTG AAC AGC	1801
	Leu Ser Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser	
	385 390 395	

DE 197 31 274 A 1

ATC GAA TGG GCT CAT CAT TAAACGCGTG CTAGAGGCAT CAAATAAAAC	1849	
Ile Glu Trp Ala His His		
400 405		5
GAAAGGCTCA GTCGAAAGAC TGGGCCTTTC GTTTTATCTG TTGTTTGTCTG GTGAACGCTC	1909	
TCCTGAGTAG GACAAATCCG CCGCCCTAGA CCTAGGGGAT ATATTCCGCT TCCTCGCTCA	1969	
CTGACTCGCT ACGCTCGGTC GTTCGACTGC GGCGAGCGGA AATGGCTTAC GAACGGGGCG	2029	10
GAGATTTCTT GGAAGATGCC AGGAAGATAC TTAACAGGGA AGTGAGAGGG CCGCGGCAAA	2089	
GCCGTTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CAAGCATCAC GAAATCTGAC GCTCAAATCA	2149	15
GTGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GCGGCTCCCT	2209	
CGTGCGCTCT CCTGTTCTTG CCTTTCGGTT TACCGGTGTC ATTCCGCTGT TATGGCCGCG	2269	20
TTTGTCTCAT TCCACGCCTG AACTCAGTT CCGGGTAGGC AGTTCGCTCC AAGCTGGACT	2329	
GTATGCACGA ACCCCCCGTT CAGTCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG	2389	
AGTCCAACCC GGAAGACAT GCAAAAGCAC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AATTGATTTA	2449	25
GAGGAGTTAG TCTTGAAGTC ATGCGCCGGT TAAGGCTAAA CTGAAAGGAC AAGTTTTGGT	2509	
GAATGCGCTC CTCCAAGCCA GTTACCTCGG TTCAAAGAGT TGGTAGCTCA GAGAACCCTC	2569	30
GAAAAACCGC CCTGCAAGGC GGTTTTTTTCG TTTTCAGAGC AAGAGATTAC GCGCAGACCA	2629	
AAACGATCTC AAGAAGATCA TCTTATTAAT CAGATAAAAT ATTTCTAGAT TTCAGTGCAA	2689	35
TTTATCTCTT CAAATGTAGC ACCTGAAGTC AGCCCCATAC GATATAAGTT GTTACTAGTG	2749	
CTTGGAATCT CACCAATAAA AAACGCCCGG CGGCAACCGA GCGTTCTGAA CAAATCCAGA	2809	
TGGAGTTCTG AGGTCATTAC TGGATCTATC AACAGGAGTC CAAGCGAGCT CTCGAACCCC	2869	40
AGAGTCCCGC TCAGAAGAAC TCGTCAAGAA GGCGATAGAA GGCGATGCGC TGCGAATCGG	2929	
GAGCGGCGAT ACCGTAAAGC ACGAGGAAGC GGTCAGCCCA TTCGCCGCCA AGCTCTTCAG	2989	45
CAATATCACG GGTAGCCAAC GCTATGTCCT GATAGCGGTC CGCCACACCC AGCCGGCCAC	3049	
AGTCGATGAA TCCAGAAAAG CGGCCATTTT CCACCATGAT ATTCGGCAAG CAGGCATCGC	3109	50
CATGGGTCAC GACGAGATCC TCGCCGTCGG GCATGCGCGC CTTGAGCCTG GCGAACAGTT	3169	
CGGCTGGCGC GAGCCCCCTGA TGCTCTTCGT CCAGATCATC CTGATCGACA AGACCGGCTT	3229	
CCATCCGAGT ACGTGCTCGC TCGATGCGAT GTTTCGCTTG GTGGTGAAT GGGCAGGTAG	3289	55
CCGGATCAAG CGTATGCAGC CGCCGCATTG CATCAGCCAT GATGGATACT TTCTCGGCAG	3349	
GAGCAAGGTG AGATGACAGG AGATCCTGCC CCGGCACCTT GCCCAATAGC AGCCAGTCCC	3409	60
TTCCCGCTTC AGTGACAACG TCGAGCACAG CTGCGCAAGG AACGCCCCGTC GTGGCCAGCC	3469	

DE 197 31 274 A 1

ACGATAGCCG CGCTGCCTCG TCCTGCAGTT CATTCAGGGC ACCGGACAGG TCGGTCTTGA 3529
 CAAAAAGAAC CGGGCGCCCC TGCCTGACA GCCGGAACAC GGCGGCATCA GAGCAGCCGA 3589
 5 TTGTCTGTTG TGCCCACTCA TAGCCGAATA GCCTCTCCAC CCAAGCGGCC GGAGAACCCTG 3649
 CGTGCAATCC ATCTTGTTCA ATCATGCGAA ACGATCCTCA TCCTGTCTCT TGATCAGATC 3709
 10 TTGATCCCCT GCGCCATCAG ATCCTTGGCG GCAAGAAAGC CATCCAGTTT ACTTTGCAGG 3769
 GCTTCCCAAC CTTACCAGAG GGCGCCCCAG CTGGCAATTC C 3810

15 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 404 Aminosäuren

20 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met	Lys	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Ser	Ala	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	1	5	10	15
Pro	Arg	Val	Ala	Glu	Lys	Met	Met	Gln	Phe	Met	Thr	Met	Asp	Gly	Thr	20	25	30	
Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Arg	Phe	Gly	Trp	Gln	Ala	Glu	35	40	45	
Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Ala	Arg	Asn	Gln	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	Gly	Ala	50	55	60	
Asp	Pro	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Glu	Ser	Asp	Asn	65	70	75	80
Leu	Ala	Ile	Lys	Gly	Ala	Ala	Asn	Phe	Tyr	Gln	Lys	Lys	Gly	Lys	His	85	90	95	
Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Glu	His	Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Cys	Arg	100	105	110	
Gln	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Glu	Val	Thr	Tyr	Leu	Ala	Pro	Gln	Arg	115	120	125	
Asn	Gly	Ile	Ile	Asp	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Met	Arg	Asp	Asp	130	135	140	
Thr	Ile	Leu	Val	Ser	Ile	Met	His	Val	Asn	Asn	Glu	Ile	Gly	Val	Val	145	150	155	160
Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Met	Cys	Arg	Ala	Arg	Gly	Ile	Ile	165	170	175	

65

DE 197 31 274 A 1

[illegible]

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 3465 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

DE 197 31 274 A 1

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pHS2bios1

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 272..1477

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

15	GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG	60
	CCCTTTCGTC TTCACCTCGA GTCCCTATCA GTGATAGAGA TTGACATCCC TATCAGTGAT	120
20	AGAGATACTG AGCACATCAG CAGGACGCAC TGACCGAATT CATTAAAGAG GAGAAAGGTA	180
	CCGGGCCCCC CCTCGAGGTC GACGGTATCG ATAAGCTTGA TATCGAATTC CTGCAGCCCCG	240
25	GGGGATCCCA TGGTACGCGT CGAGGAGTAC C ATG AAC GTT TTT AAT CCC GCG	292
	Met Asn Val Phe Asn Pro Ala	
	1 5	
30	CAG TTT CGC GCC CAG TTT CCC GCA CTA CAG GAT GCG GGC GTC TAT CTC	340
	Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu	
	10 15 20	
35	GAC AGC GCC GCG ACC GCG CTT AAA CCT GAA GCC GTG GTT GAA GCC ACC	388
	Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro Glu Ala Val Val Glu Ala Thr	
	25 30 35	
40	CAA CAG TTT TAC AGT CTG AGC GCC GGA AAC GTC CAT CGC AGC CAG TTT	436
	Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly Asn Val His Arg Ser Gln Phe	
	40 45 50 55	
45	GCC GAA GCC CAA CGC CTG ACC GCG CGT TAT GAA GCT GCA CGA GAG AAA	484
	Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys	
	60 65 70	
50	GTG GCG CAA TTA CTG AAT GCA CCG GAT GAT AAA ACT ATC GTC TGG ACG	532
	Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr	
	75 80 85	
55	CGC GGC ACC ACT GAA TCC ATC AAC ATG GTG GCA CAA TGC TAT GCG CGT	580
	Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg	
	90 95 100	
60	CCG CGT CTG CAA CCG GGC GAT GAG ATT ATT GTC AGC GTG GCA GAA CAC	628
	Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile Ile Val Ser Val Ala Glu His	
	105 110 115	

DE 197 31 274 A 1

CAC GCC AAC CTC GTC CCC TGG CTG ATG GTC GCC CAA CAA ACT GGA GCC His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala 120 125 130 135	676	5
AAA GTG GTG AAA TTG CCG CTT AAT GCG CAG CGA CTG CCG GAT GTC GAT Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp 140 145 150	724	10
TTG TTG CCA GAA CTG ATT ACT CCC CGT AGT CGG ATT CTG GCG TTG GGT Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly 155 160 165	772	15
CAG ATG TCG AAC GTT ACT GGC GGT TGC CCG GAT CTG GCG CGA GCG ATT Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile 170 175 180	820	20
ACC TTT GCT CAT TCA GCC GGG ATG GTG GTG ATG GTT GAT GGT GCT CAG Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val Val Met Val Asp Gly Ala Gln 185 190 195	868	25
GGG GCA GTG CAT TTC CCC GCG GAT GTT CAG CAA CTG GAT ATT GAT TTC Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe 200 205 210 215	916	30
TAT GCT TTT TCA GGT CAC AAA CTG TAT GGC CCG ACA GGT ATC GGC GTG Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val 220 225 230	964	35
CTG TAT GGT AAA TCA GAA CTG CTG GAG GCG ATG TCG CCC TGG CTG GGC Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly 235 240 245	1012	40
GGC GGC AAA ATG GTT CAC GAA GTG AGT TTT GAC GGC TTC ACG ACT CAA Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln 250 255 260	1060	45
TCT GCG CCG TGG AAA CTG GAA GCT GGA ACG CCA AAT GTC GCT GGT GTC Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly Thr Pro Asn Val Ala Gly Val 265 270 275	1108	50
ATA GGA TTA AGC GCG GCG CTG GAA TGG CTG GCA GAT TAC GAT ATC AAC Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn 280 285 290 295	1156	55
CAG GCC GAA AGC TGG AGC CGT AGC TTA GCA ACG CTG GCG GAA GAT GCG Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala 300 305 310	1204	60
CTG GCG AAA CGT CCC GGC TTT CGT TCA TTC CGC TGC CAG GAT TCC AGC Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser 315 320 325	1252	65

DE 197 31 274 A 1

5	CTG CTG GCC TTT GAT TTT GCT GGC GTT CAT CAT AGC GAT ATG GTG ACG Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val His His Ser Asp Met Val Thr 330 335 340	1300
10	CTG CTG GCG GAG TAC GGT ATT GCC CTG CGG GCC GGG CAG CAT TGC GCT Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu Arg Ala Gly Gln His Cys Ala 345 350 355	1348
15	CAG CCG CTA CTG GCA GAA TTA GGC GTA ACC GGC ACA CTG CGC GCC TCT Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser 360 365 370 375	1396
20	TTT GCG CCA TAT AAT ACA AAG AGT GAT GTG GAT GCG CTG GTG AAT GCC Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp Val Asp Ala Leu Val Asn Ala 380 385 390	1444
25	GTT GAC CGC GCG CTG GAA TTA TTG GTG GAT TAAACGCGTG CTAGAGGCAT Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val Asp 395 400	1494
30	CAAATAAAAC GAAAGGCTCA GTCGAAAGAC TGGGCCTTTC GTTTTATCTG TTGTTTGTCTG GTGAACGCTC TCCTGAGTAG GACAAATCCG CCGCCCTAGA CCTAGGGGAT ATATTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT ACGCTCGGTC GTTCGACTGC GGCGAGCGGA AATGGCTTAC GAACGGGGCG GAGATTTTCTT GGAAGATGCC AGGAAGATAC TTAACAGGGA AGTGAGAGGG CCGCGGCAAA GCCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CAAGCATCAC GAAATCTGAC GCTCAAATCA GTGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GCGGCTCCCT CGTGCCTCTT CCTGTTCTCTG CCTTTCGGTT TACCGGTGTC ATTCCGCTGT TATGGCCGCG TTTGTCTCAT TCCACGCCTG AACTCAGTT CCGGGTAGGC AGTTCGCTCC AAGCTGGACT GTATGCACGA ACCCCCCGTT CAGTCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGAAAGACAT GCAAAGCAC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AATTGATTTA GAGGAGTTAG TCTTGAAGTC ATGCGCCGGT TAAGGCTAAA CTGAAAGGAC AAGTTTTGGT GACTGCGCTC CTCCAAGCCA GTTACCTCGG TTCAAAGAGT TGGTAGCTCA GAGAACCTTC GAAAAACCGC CCTGCAAGGC GGTTTTTTTCG TTTTCAGAGC AAGAGATTAC GCGCAGACCA AAACGATCTC AAGAAGATCA TCTTATTAAT CAGATAAAAT ATTTCTAGAT TTCAGTGCAA TTTATCTCTT CAAATGTAGC ACCTGAAGTC AGCCCCATAC GATATAAGTT GTTACTAGTG CTTGGATTCT CACCAATAAA AAACGCCCGG CGGCAACCGA GCGTTCTGAA CAAATCCAGA TGGAGTTCTG AGGTCATTAC TGGATCTATC AACAGGAGTC CAAGCGAGCT CTCGAACCCC AGAGTCCCGC TCAGAAGAAC TCGTCAAGAA GGCGATAGAA GGCGATGCGC	1554 1614 1674 1734 1794 1854 1914 1974 2034 2094 2154 2214 2274 2334 2394 2454 2514 2574

DE 197 31 274 A 1

TGCGAATCGG GAGCGGCGAT ACCGTAAAGC ACGAGGAAGC GGTCAGCCCA TTCGCCGCCA 2634
 AGCTCTTCAG CAATATCACG GGTAGCCAAC GCTATGTCCT GATAGCGGTC CGCCACACCC 2694
 AGCCGGCCAC AGTCGATGAA TCCAGAAAAG CGGCCATTTT CCACCATGAT ATTCCGGCAAG 2754
 CAGGCATCGC CATGGGTCAC GACGAGATCC TCGCCGTCGG GCATGCGCGC CTTGAGCCTG 2814
 GCGAACAGTT CGGCTGGCGC GAGCCCCCTGA TGCTCTTCGT CCAGATCATC CTGATCGACA 2874
 AGACCGGCTT CCATCCGAGT ACGTGCTCGC TCGATGCGAT GTTTCGCTTG GTGGTCGAAT 2934
 GGGCAGGTAG CCGGATCAAG CGTATGCAGC CGCCGCATTG CATCAGCCAT GATGGATACT 2994
 TTCTCGGCAG GAGCAAGGTG AGATGACAGG AGATCCTGCC CCGGCACTTC GCCCAATAGC 3054
 AGCCAGTCCC TTCCCGCTTC AGTGACAACG TCGAGCACAG CTGCGCAAGG AACGCCCCGTC 3114
 GTGGCCAGCC ACGATAGCCG CGCTGCCTCG TCCTGCAGTT CATTGAGGGC ACCGGACAGG 3174
 TCGGTCTTGA CAAAAAGAAC CGGGCGCCCC TCGCTGACA GCCGGAACAC GGCGGCATCA 3234
 GAGCAGCCGA TTGTCTGTTG TGCCCAGTCA TAGCCGAATA GCCTCTCCAC CCAAGCGGCC 3294
 GGAGAACCTG CGTGCAATCC ATCTTGTTCA ATCATGCGAA ACGATCCTCA TCCTGTCTCT 3354
 TGATCAGATC TTGATCCCCT GCGCCATCAG ATCCTTGGCG GCAAGAAAGC CATCCAGTTT 3414
 ACTTTGCAGG GCTTCCCAAC CTTACCAGAG GGCGCCCCAG CTGGCAATTC C 3465

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 401 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
 20 25 30

Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly
 35 40 45

Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg
 50 55 60

Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp
 65 70 75 80

DE 197 31 274 A 1

	Asp	Lys	Thr	Ile	Val	Trp	Thr	Arg	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Ile	Asn	Met	85	90	95
5	Val	Ala	Gln	Cys	Tyr	Ala	Arg	Pro	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Glu	Ile	100	105	110
10	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Glu	His	His	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Trp	Leu	Met	115	120	125
15	Val	Ala	Gln	Gln	Thr	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Leu	Asn	Ala	130	135	140
	Gln	Arg	Leu	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Ile	Thr	Pro	Arg	145	150	155
20	Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Cys	165	170	175
25	Pro	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Phe	Ala	His	Ser	Ala	Gly	Met	Val	180	185	190
30	Val	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Val	His	Phe	Pro	Ala	Asp	Val	195	200	205
	Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Leu	Tyr	210	215	220
35	Gly	Pro	Thr	Gly	Ile	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Glu	225	230	235
40	Ala	Met	Ser	Pro	Trp	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Val	His	Glu	Val	Ser	245	250	255
	Phe	Asp	Gly	Phe	Thr	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	Trp	Lys	Leu	Glu	Ala	Gly	260	265	270
45	Thr	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Glu	Trp	275	280	285
50	Leu	Ala	Asp	Tyr	Asp	Ile	Asn	Gln	Ala	Glu	Ser	Trp	Ser	Arg	Ser	Leu	290	295	300
55	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Leu	Ala	Lys	Arg	Pro	Gly	Phe	Arg	Ser	305	310	315
	Phe	Arg	Cys	Gln	Asp	Ser	Ser	Leu	Leu	Ala	Phe	Asp	Phe	Ala	Gly	Val	325	330	335
60	His	His	Ser	Asp	Met	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Glu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Leu	340	345	350
65	Arg	Ala	Gly	Gln	His	Cys	Ala	Gln	Pro	Leu	Leu	Ala	Glu	Leu	Gly	Val	355	360	365

DE 197 31 274 A 1

Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
370 375 380

Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
385 390 395 400

Asp

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 3481 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pHS2bioS2

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 279..1493

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GACGTCTAAG AAACCATAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG	60
CCCTTTCGTC TTCACCTCGA GTCCCTATCA GTGATAGAGA TTGACATCCC TATCAGTGAT	120 40
AGAGATACTG AGCACATCAG CAGGACGCAC TGACCGAATT CATTAAGAG GAGAAAGGTA	180
CCGGGCCCCC CCTCGAGGTC GACGGTATCG ATAAGCTTGA TATCGAATTC CTGCAGCCCG	240 45
GGGGATCCCA TGGTACGCGT AAAGAGGAGA AATTAAT ATG AAA TTA CCG ATT	293
Met Lys Leu Pro Ile	
1 5	50
TAT CTC GAC TAC TCC GCA ACC ACG CCG GTG GAC CCG CGT GTT GCC GAG	341
Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Thr Thr Pro Val Asp Pro Arg Val Ala Glu	
10 15 20	55
AAA ATG ATG CAG TTT ATG ACG ATG GAC GGA ACC TTT GGT AAC CCG GCC	389
Lys Met Met Gln Phe Met Thr Met Asp Gly Thr Phe Gly Asn Pro Ala	
25 30 35	60

65

DE 197 31 274 A 1

	TCC CGT TCT CAC CGT TTC GGC TGG CAG GCT GAA GAA GCG GTA GAT ATC	437
	Ser Arg Ser His Arg Phe Gly Trp Gln Ala Glu Glu Ala Val Asp Ile	
5	40 45 50	
	GCC CGT AAT CAG ATT GCC GAT CTG GTC GGC GCT GAT CCG CGT GAA ATC	485
	Ala Arg Asn Gln Ile Ala Asp Leu Val Gly Ala Asp Pro Arg Glu Ile	
	55 60 65	
10	GTC TTT ACC TCT GGT GCA ACC GAA TCT GAC AAC CTG GCG ATC AAA GGT	533
	Val Phe Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ser Asp Asn Leu Ala Ile Lys Gly	
	70 75 80 85	
15	GCA GCC AAC TTT TAT CAG AAA AAA GGC AAG CAC ATC ATC ACC AGC AAA	581
	Ala Ala Asn Phe Tyr Gln Lys Lys Gly Lys His Ile Ile Thr Ser Lys	
	90 95 100	
20	ACC GAA CAC AAA GCG GTA CTG GAT ACC TGC CGT CAG CTG GAG CGC GAA	629
	Thr Glu His Lys Ala Val Leu Asp Thr Cys Arg Gln Leu Glu Arg Glu	
	105 110 115	
25	GGT TTT GAA GTC ACC TAC CTG GCA CCG CAG CGT AAC GGC ATT ATC GAC	677
	Gly Phe Glu Val Thr Tyr Leu Ala Pro Gln Arg Asn Gly Ile Ile Asp	
	120 125 130	
30	CTG AAA GAA CTT GAA GCA GCG ATG CGT GAC GAC ACC ATC CTC GTG TCC	725
	Leu Lys Glu Leu Glu Ala Ala Met Arg Asp Asp Thr Ile Leu Val Ser	
	135 140 145	
35	ATC ATG CAC GTA AAT AAC GAA ATC GGC GTG GTG CAG GAT ATC GCG GCT	773
	Ile Met His Val Asn Asn Glu Ile Gly Val Val Gln Asp Ile Ala Ala	
	150 155 160 165	
40	ATC GGC GAA ATG TGC CGT GCT CGT GGC ATT ATC TAT CAC GTT GAT GCA	821
	Ile Gly Glu Met Cys Arg Ala Arg Gly Ile Ile Tyr His Val Asp Ala	
	170 175 180	
45	ACC CAG AGC GTG GGT AAA CTG CCT ATC GAC CTG AGC CAG TTG AAA GTT	869
	Thr Gln Ser Val Gly Lys Leu Pro Ile Asp Leu Ser Gln Leu Lys Val	
	185 190 195	
50	GAC CTG ATG TCT TTC TCC GGT CAC AAA ATC TAT GGC CCG AAA GGT ATC	917
	Asp Leu Met Ser Phe Ser Gly His Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Gly Ile	
	200 205 210	
55	GGT GCG CTG TAT GTA CGT CGT AAA CCG CGC GTA CGC ATC GAA GCG CAA	965
	Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val Arg Ile Glu Ala Gln	
	215 220 225	
60	ATG CAC GGC GGC GGT CAC GAG CGC GGT ATG CGT TCC GGC ACT CTG CCT	1013
	Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg Ser Gly Thr Leu Pro	
	230 235 240 245	

DE 197 31 274 A 1

GTT CAC CAG ATC GTC GGA ATG GGC GAG GCC TAT CGC ATC GCA AAA GAA Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr Arg Ile Ala Lys Glu 250 255 260	1061	
GAG ATG GCG ACC GAG ATG GAA CGT CTG CGC GGC CTG CGT AAC CGT CTG Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly Leu Arg Asn Arg Leu 265 270 275	1109	5
TGG AAC GGC ATC AAA GAT ATC GAA GAA GTT TAC CTG AAC GGT GAC CTG Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu 280 285 290	1157	10
GAA CAC GGT GCG CCG AAC ATT CTC AAC GTC AGC TTC AAC TAC GTT GAA Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser Phe Asn Tyr Val Glu 295 300 305	1205	15
GGT GAG TCG CTG ATT ATG GCG CTG AAA GAC CTC GCA GTT TCT TCA GGT Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu Ala Val Ser Ser Gly 310 315 320 325	1253	20
TCC GCC TGT ACG TCA GCA AGC CTC GAA CCG TCC TAC GTG CTG CGC GCG Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser Tyr Val Leu Arg Ala 330 335 340	1301	25
CTG GGG CTG AAC GAC GAG CTG GCA CAT AGC TCT ATC CGT TTC TCT TTA Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser Ile Arg Phe Ser Leu 345 350 355	1349	30
GGT CGT TTT ACT ACT GAA GAA GAG ATC GAC TAC ACC ATC GAG TTA GTT Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr Thr Ile Glu Leu Val 360 365 370	1397	35
CGT AAA TCC ATC GGT CGT CTG CGT GAC CTT TCT CCG CTG TGG GAA ATG Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser Pro Leu Trp Glu Met 375 380 385	1445	40
TAC AAG CAG GGC GTG GAT CTG AAC AGC ATC GAA TGG GCT CAT CAT TAAACGCGTG Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu Trp Ala His His 390 395 400 405	1500	45
CTAGAGGCAT CAAATAAAAC GAAAGGCTCA GTCGAAAGAC TGGGCCTTTC GTTTTATCTG	1560	
TTGTTTGTGCG GTGAACGCTC TCCTGAGTAG GACAAATCCG CCGCCCTAGA CCTAGGGGAT	1620	
ATATTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT ACGCTCGGTC GTTCGACTGC GGCGAGCGGA	1680	50
AATGGCTTAC GAACGGGGCG GAGATTTCCCT GGAAGATGCC AGGAAGATAC TTAACAGGGA	1740	
AGTGAGAGGG CCGCGGCAAA GCCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CAAGCATCAC	1800	55
GAAATCTGAC GCTCAAATCA GTGGTGSCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG	1860	
TTTCCCCCTG GCGGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCTG CTTTCGGTT TACCGGTGTC	1920	60

DE 197 31 274 A 1

	ATCCGCTGT TATGGCCGCG TTTGTCTCAT TCCACGCCTG ACACTCAGTT CCGGGTAGGC	1980
	AGTTCGCTCC AAGCTGGACT GTATGCACGA ACCCCCCGTT CAGTCCGACC GCTGCGCCTT	2040
5	ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC CGAAAGACAT GCAAAAGCAC CACTGGCAGC	2100
	AGCCACTGGT AATTGATTTA GAGGAGTTAG TCTTGAAGTC ATGCGCCGGT TAAGGCTAAA	2160
10	CTGAAAGGAC AAGTTTTGGT GACTGCGCTC CTCCAAGCCA GTTACCTCGG TTCAAAGAGT	2220
	TGGTAGCTCA GAGAACCCTC GAAAAACCGC CCTGCAAGGC GGTTTTTTTCG TTTTCAGAGC	2280
15	AAGAGATTAC GCGCAGACCA AAACGATCTC AAGAAGATCA TCTTATTAAT CAGATAAAAT	2340
	ATTTCTAGAT TTCAGTGCAA TTTATCTCTT CAAATGTAGC ACCTGAAGTC AGCCCCATAC	2400
20	GATATAAGTT GTTACTAGTG CTTGCATTCT CACCAATAAA AAACGCCCCG CGGCAACCGA	2460
	GCGTCTTGAA CAAATCCAGA TCGAGTTCTG AGGTCATTAC TGGATCTATC AACAGGAGTC	2520
	CAAGCGAGCT CTCGAACCCC AGAGTCCCGC TCAGAAGAAC TCGTCAAGAA GGCGATAGAA	2580
25	GGCGATGCGC TGCGAATCGG GAGCGGCGAT ACCGTAAAGC ACGAGGAAGC GGTCAGCCCA	2640
	TCGCGCGCCA AGCTCTTCAG CAATATCACG GGTAGCCAAC GCTATGTCCT GATAGCGGTC	2700
30	CGCCACACCC AGCCGCGCCAC AGTCGATGAA TCCAGAAAAG CGGCCATTTT CCACCATGAT	2760
	ATTCGGCAAG CAGGCATCGC CATGGGTCAC GACGAGATCC TCGCCGTCGG GCATGCGCGC	2820
35	CTTGAGCCTG GCGAACAGTT CGGCTGGCGC GAGCCCCTGA TGCTCTTCGT CCAGATCATC	2880
	CTGATCGACA AGACCGGCTT CCATCCGAGT ACGTGCTCGC TCGATGCGAT GTTTCGCTTG	2940
	GTGGTCGAAT GGGCAGGTAG CCGGATCAAG CGTATGCAGC CGCCGCATTG CATCAGCCAT	3000
40	GATGGATACT TTCTCGGCAG GAGCAAGGTG AGATGACAGG AGATCCTGCC CCGGCACTTC	3060
	GCCCAATAGC AGCCAGTCCC TTCCCGCTTC AGTGACAACG TCGAGCACAG CTGCGCAAGG	3120
45	AACGCCCCGTC GTGGCCAGCC ACGATAGCCG CGCTGCCTCG TCCTGCAGTT CATTCAGGGC	3180
	ACCGGACAGG TCGGTCTTGA CAAAAAGAAC CGGGCGCCCC TCGCTGACA GCCGGAACAC	3240
	GGCGGCATCA GAGCAGCCGA TTGTCTGTTG TGCCAGTCA TAGCCGAATA GCCTCTCCAC	3300
50	CCAAGCGGCC GGAGAAECTG CGTGCAATCC ATCTTGTTCA ATCATGCGAA ACGATCCTCA	3360
	TCCTGTCTCT TGATCAGATC TTGATCCCTT GCGCCATCAG ATCCTTGGCG GCAAGAAAGC	3420
55	CATCCAGTTT ACTTTGCAGG GCTTCCCAAC CTTACCAGAG GGCGCCCCAG CTGGCAATTC	3480
	C	3481

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

DE 197 31 274 A 1

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 404 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

10

Met Lys Leu Pro Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Thr Thr Pro Val Asp
1 5 10 15

15

Pro Arg Val Ala Glu Lys Met Met Gln Phe Met Thr Met Asp Gly Thr
20 25 30

Phe Gly Asn Pro Ala Ser Arg Ser His Arg Phe Gly Trp Gln Ala Glu
35 40 45

20

Glu Ala Val Asp Ile Ala Arg Asn Gln Ile Ala Asp Leu Val Gly Ala
50 55 60

25

Asp Pro Arg Glu Ile Val Phe Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ser Asp Asn
65 70 75 80

30

Leu Ala Ile Lys Gly Ala Ala Asn Phe Tyr Gln Lys Lys Gly Lys His
85 90 95

Ile Ile Thr Ser Lys Thr Glu His Lys Ala Val Leu Asp Thr Cys Arg
100 105 110

35

Gln Leu Glu Arg Glu Gly Phe Glu Val Thr Tyr Leu Ala Pro Gln Arg
115 120 125

40

Asn Gly Ile Ile Asp Leu Lys Glu Leu Glu Ala Ala Met Arg Asp Asp
130 135 140

Thr Ile Leu Val Ser Ile Met His Val Asn Asn Glu Ile Gly Val Val
145 150 155 160

45

Gln Asp Ile Ala Ala Ile Gly Glu Met Cys Arg Ala Arg Gly Ile Ile
165 170 175

50

Tyr His Val Asp Ala Thr Gln Ser Val Gly Lys Leu Pro Ile Asp Leu
180 185 190

55

Ser Gln Leu Lys Val Asp Leu Met Ser Phe Ser Gly His Lys Ile Tyr
195 200 205

Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val
210 215 220

60

Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg
225 230 235 240

65

Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr
 245 250 255
 5 Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly
 260 265 270
 10 Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr
 275 280 285
 Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser
 290 295 300
 15 Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu
 305 310 315 320
 20 Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser
 325 330 335
 Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser
 25 340 345 350
 Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr
 355 360 365
 30 Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser
 370 375 380
 35 Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu
 385 390 395 400
 Trp Ala His His

40

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Biotin, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Biotingen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 sowie seine funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus, der in der Lage ist Biotin zu synthetisieren, exprimiert, diesen züchtet und das synthetisierte Biotin direkt, nach Abtrennung der Biomasse oder nach Reinigung des Biotins verwendet.
 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Biotingene nach Anspruch 1 zu einer gesteigerten Umwandlung von Dethiobiotin in Biotin führt.
 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Varianten um Gene handelt, die auf der von den Sequenzen nach Anspruch 1 abgeleiteten Aminosäureebene eine Homologie von 40 bis 100% aufweisen und eine gesteigerte Biotinsynthese ermöglichen.
 4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsorganismus ein Organismus ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen Escherichia, Citrobacter, Serratia, Klebsiella, Salmonella, Pseudomonas, Comamonas, Acinetobacter, Azotobacter, Chromobacterium, Bacillus, Clostridium, Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Lactococcus, Lactobacillus, Streptomyces, Rhizobium, Agrobacterium, Staphylococcus, Rhodotorula, Sporobolomyces, Yarrowia, Schizosaccharomyces oder Saccharomyces verwendet wird.
 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsorganismus eine regulationsdefekte Biotinmutante verwendet wird.
 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression mindestens einer Kopie der Biotingene nach Anspruch 1 allein oder mit einer oder mehreren Kopien mindestens eines weiteren Biotingens ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioH, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus erfolgt.
 7. Genkonstrukt enthaltend ein Biotingen mit der SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3, sowie seine funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate, das mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression und/oder Proteinexpression funktionell verknüpft ist und/oder dessen natürliche Regulation ausgeschaltet wurde.
 8. Genkonstrukt nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Vektor inseriert wurde, der für die Expression des Gens in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus geeignet ist.

DE 197 31 274 A 1

9. Genkonstrukt nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Biotingene nach Anspruch 7 in einer oder mehreren Kopien zusammen mit einer oder mehreren Kopien mindestens eines weiteren Gens ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR im Vektor vorliegt.
10. Organismen enthaltend ein Genkonstrukt gemäß den Ansprüchen 7 bis 9.
11. Verwendung einer Sequenz gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Biotin. 5
12. Verwendung eines Genkonstrukts gemäß den Ansprüchen 7 bis 9 zur Herstellung von Biotin.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

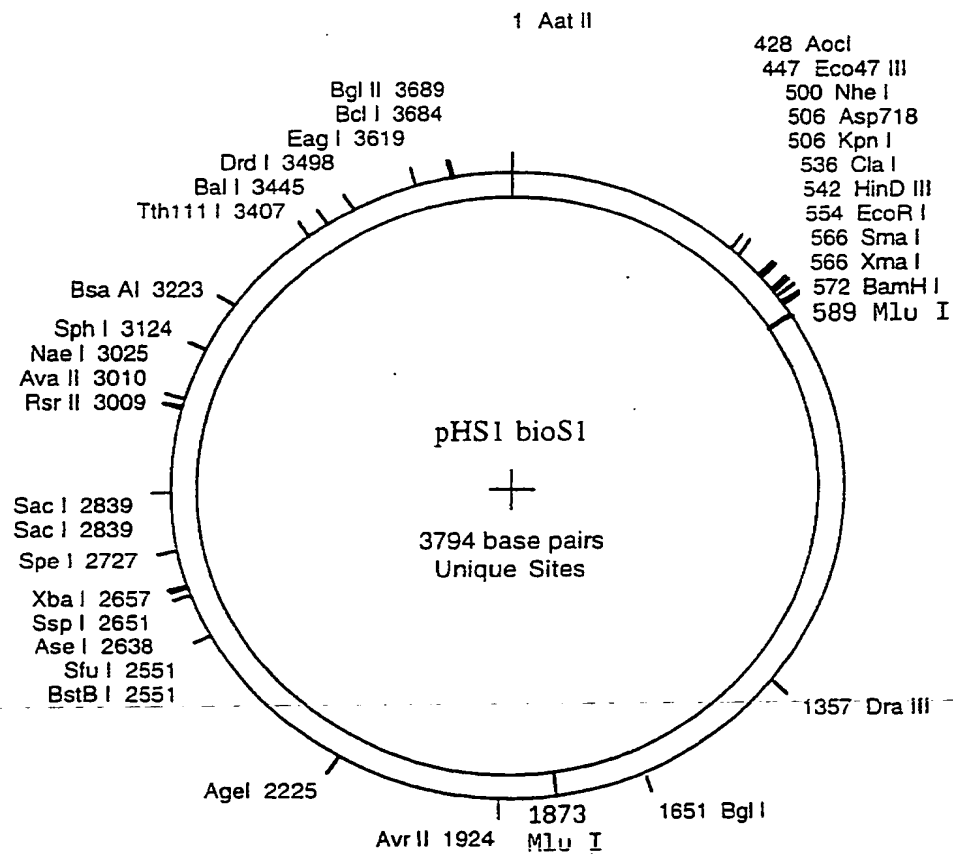
55

60

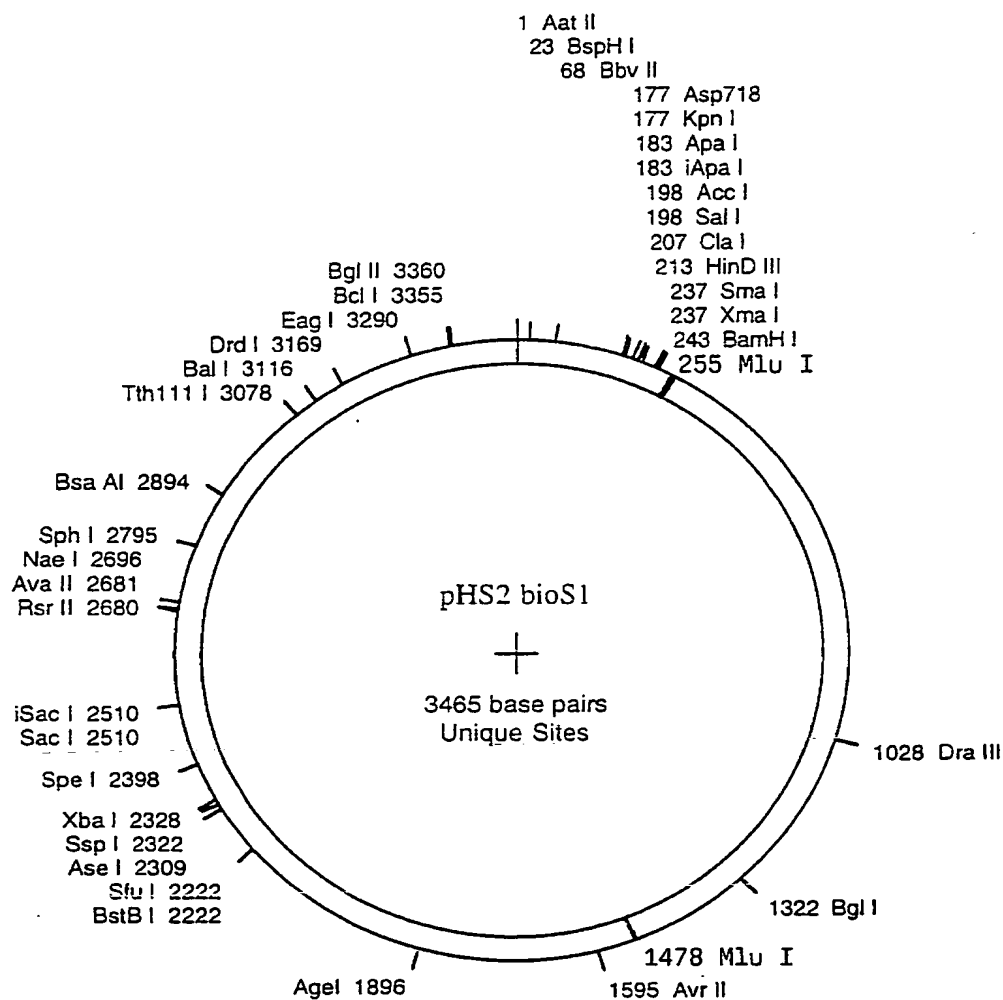
65

- Leerseite -

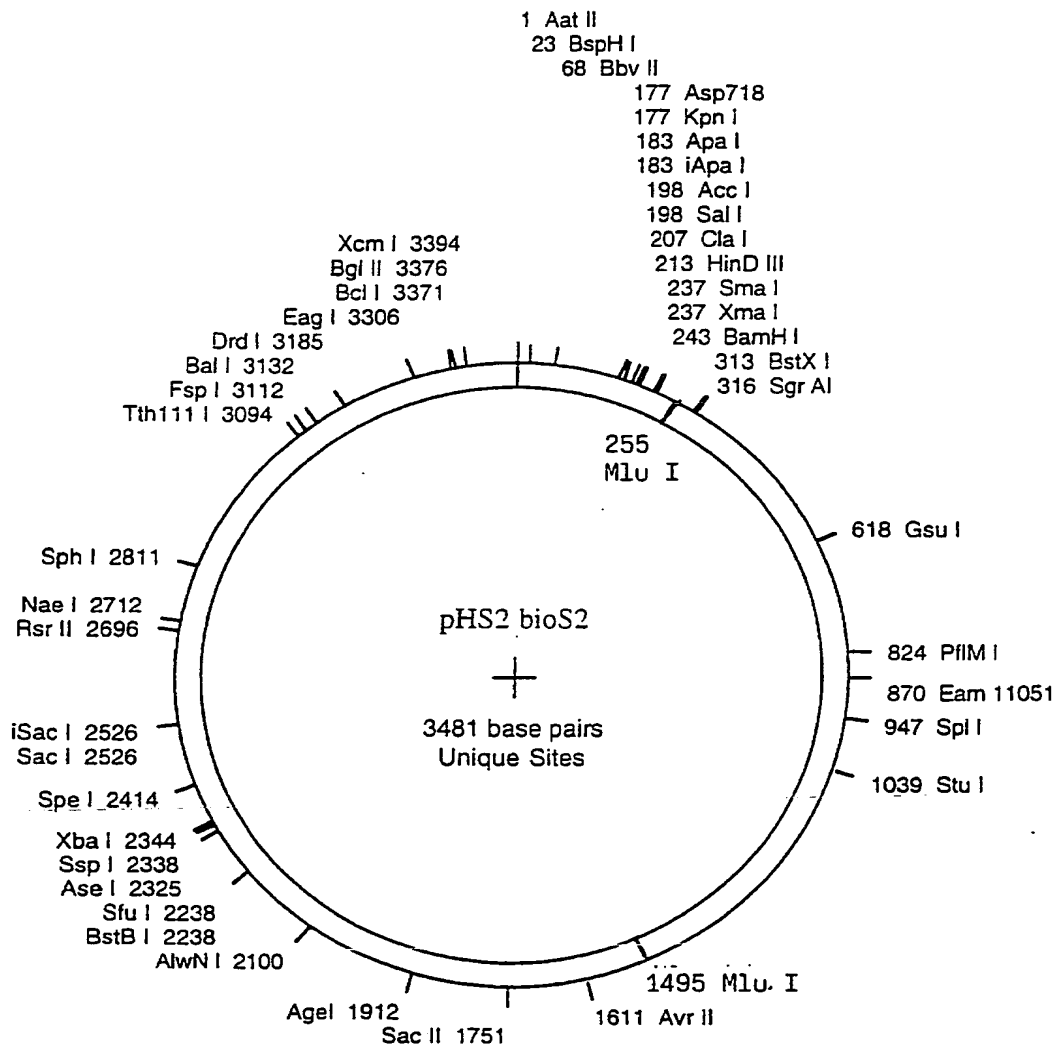
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4

